Wirkung von Antibiotika auf Wachstum und Ionenaufnahme bei Zea Mays L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Gerhard Hool
aus Zofingen

1967

Büchler + Co AG Wabern - 1967

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *Max Geiger-Huber*
Dr. *Heinrich Zoller*

Basel, den 28. Februar 1967

Prof. Dr. *H. Huber*, Dekan

Separatabdruck aus «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1967, Band 77
(Als Sonderdruck ausgegeben am 4. Oktober 1967)

Wirkung von Antibiotika auf Wachstum und Ionenaufnahme bei Zea Mays L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Gerhard Hool

aus Zofingen

Büchler + Co AG Wabern - 1967

Wirkung von Antibiotika auf Wachstum und Ionenaufnahme bei Zea Mays L.

Von *Gerhard Hool*

Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel

Manuskript eingegangen am 16. März 1967

Inhaltsverzeichnis Seite

Einleitung ... 211

Material und Methode ... 212

Versuchsobjekt ... 212

Nährlösung ... 213

Strontiumzusatz ... 214

Antibiotikumzusatz ... 214

Kultivierungsbedingungen ... 215

Kontrolle der Aktivität der Antibiotika ... 215

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials ... 216

Die Aktivierungsanalyse ... 216

Statistische Sicherung der Resultate ... 222

Versuche und Resultate ... 222

Voruntersuchungen ... 222

Stabilität der Antibiotika in einer Pfeffer-Robbins-Nährlösung ... 222

Bestimmung der toxisch wirkenden Dosis ... 224

Einfluss des Entfernens der Karyopsen auf die Empfindlichkeit der Pflanzen gegenüber Antibiotikawirkungen ... 226

Antibiotikumzusatz und dadurch resultierende pH-Verschiebungen in der Nährlösung ... 226

Nachweis aufgenommener Antibiotika in Wurzel und Spross ... 227

Hauptuntersuchungen ... 229

Die Beeinflussung der Pigmentbildung ... 229

Der Einfluss auf das Wachstum ... 231

Beeinflussung des Längenwachstums ... 232

Beeinflussung des Trockengewichtes ... 235

Der Einfluss auf die Wasseraufnahme ... 235

Der Einfluss auf die Ionenaufnahme ... 237

Die Effekte auf die Kaliumaufnahme ... 238

Die Effekte auf die Calciumaufnahme ... 242

Die Effekte auf die Strontiumaufnahme ... 242

Diskussion ... 246

Zusammenfassung ... 249

Literaturverzeichnis ... 251

UNIV. LEIDEN BIBL.

Einleitung

Der Lebensraum einer Pflanze, insbesondere der Boden als natürliches Nährmilieu, ist ein sehr komplexes System. Nicht nur die Bodenbeschaffenheit selbst, wie etwa seine Struktur, seine chemische Zusammensetzung und Azidität, beeinflusst das Gedeihen einer Pflanze, sondern in entscheidender Weise wirkt auch eine ganze Anzahl anderer Faktoren auf ihr Wachstum und ihren Stoffwechsel ein.

Im engen Gefüge von Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen herrscht im Boden eine dauernde Konkurrenz um die vorhandenen Nährstoffe. Eine nicht geringe Rolle spielen Stoffwechselprodukte, die vor allem von den Mikroorganismen ausgeschieden werden, in die Rhizosphäre gelangen und in der Folge das Wachstum der verschiedenen Bewohner beeinflussen können. Zu solchen Ausscheidungsprodukten gehören die verschiedensten Antibiotika, die von der höheren Pflanze mit der Bodenlösung aufgenommen werden und damit einen gewissen Einfluss auf die Lebensvorgänge im pflanzlichen Organismus haben dürften.

Die antibiotischen Stoffe hemmen, zumindest bei Bakterien, meist in spezifischer Weise bestimmte Stoffwechselvorgänge (Brock, 1961; Pestka et al., 1965; Strominger und Tipper, 1965; Yudkin, 1963; Zähner, 1964, 1965, weitere Literatur siehe daselbst). Aus diesem Grunde ist ganz allgemein eine Beeinflussung des Wachstums zu erwarten.

So sind Untersuchungen über das Wachstum und die Teilungsrate von Mikroorganismen gemacht worden, wobei stets ein hemmender Einfluss festgestellt wurde (Aaronson und Scher, 1960; Jirovec, 1949).

Ebenfalls hemmender Natur waren die Wirkungen der verschiedensten Antibiotika auf die Samenkeimung (Black und Richardson, 1965; Euler, 1950, 1953; Wright, 1951, weitere Literatur daselbst) und das Wachstum von Wurzel oder Spross (Bandi, 1957; Bein et al., 1947; Nooden und Thimann, 1963; Seiler, 1951; Weihe, 1953).

Als weiterer Effekt muss die Hemmung von Pigmentsynthese und Plastidenbildung genannt werden. Mitteilungen hierüber stammen vor allem aus Untersuchungen mit Mikroorganismen (De Deken und Godts, 1960; Drawert und Mix, 1961; Ebringer, 1963, weitere Literatur daselbst.) Weniger zahlreich sind diesbezügliche Untersuchungen an höheren Pflanzen (Kirk und Allen, 1965; Ledoyen, 1957; Sato, 1959, 1960; Schopfer et al., 1951, 1952; Signol, 1961).

Die Antibiotika können, wie sich jedoch gezeigt hat, nicht allgemein als Inhibitoren betrachtet werden, sind doch – wenn auch in viel geringerer Zahl – auch fördernde Wirkungen beobachtet worden (Barton und MacNab, 1954; Bilge, 1962; Brian, 1957; Nickell, 1952, 1953; Nickell und Finlay, 1954).

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Antibiotikawirkung ist diejenige nach der Beeinflussung der Ionenaufnahme.

Bis heute ist darüber nur wenig bekannt. Norman (1959) untersuchte die Wirkung verschiedener neuerer Antibiotika auf das Wachstum und die Ionenaufnahme bei abgeschnittenen Gerstenwurzeln. Frei (1963) fand eine Hemmung der Strontiumaufnahme bei Mais durch Citrinin und Patulin und Hodges (1966) eine solche des Kaliumtransportes in Wurzeln von *Avena sativa* durch Oligomycin.

Im weiteren beschränken sich die Mitteilungen fast ausschliesslich auf die hemmenden Einflüsse von Chloramphenicol, da dieses Antibiotikum in verschiedenen Arbeiten vor allem als Inhibitor der Proteinsynthese in Untersuchungen über den aktiven Prozess bei der Ionenaufnahme verwendet wurde (Balogh et al., 1961; Ellis, 1963; Hanson und Hodges, 1963; Höfner, 1963; Jyung und Wittwer, 1964; Jyung et al., 1965; Sutcliffe, 1960; Uhler, 1961; Uhler und Russell, 1963).

Es schien daher interessant, den Einfluss von Penicillin, Streptomycin sowie Chloramphenicol auf die Ionenaufnahme von intakten Pflanzen in Verbindung mit der Wirkung dieser Antibiotika auf das Wachstum näher zu untersuchen und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

Material und Methode

Versuchsobjekt

Versuchsobjekt dieser Arbeit war *Zea Mays* L., Sorte «Saatmais, Ohio M34 (F2)», als ein für physiologische Versuche relativ gut bekannter Vertreter höherer Pflanzen.

Für physiologische Versuche – insbesondere über die Ionenaufnahme – ist eine Auslese zur Erlangung möglichst homogenen Materials ausserordentlich wichtig. Dieses Ziel wurde in meinen Versuchen bis zum Moment der Antibiotikazugabe (also dem Zeitpunkt des eigentlichen Beginns des Experiments) angestrebt:

1. durch Auswahl gesunder, möglichst gleich grosser Maiskaryopsen,
2. durch Weiterverwendung möglichst gleichwertiger Keimlinge nach der Keimung und
3. durch Bildung von Pflanzengruppen, entsprechend der Anzahl Versuchsbedingungen (z.B. Antibiotikumkonzentrationen), welche, miteinander verglichen, möglichst gleichwertiges Pflanzenmaterial aufwiesen.

Auf eine völlig aseptische Aufzucht konnte verzichtet werden, da eine rein mineralische Nährlösung zur Verwendung kam. In der Folge wurde

auch nie eine Infektion durch Pilze oder Bakterien der Kulturlösungen oder des Pflanzenmaterials festgestellt.

Immerhin wurden gewisse Vorsichtsmassnahmen getroffen, um einer Infektion vorzubeugen. So wurde der Fruchtstiel der Karyopsen abgebrannt, die Früchte anschliessend gewaschen und während 2 Stunden in Brom 1:500 äusserlich sterilisiert (Bürgin-Wolff, 1959).

Nach 24stündiger Quellung im sterilisierten Quellapparat (Burlet, 1940) mit dauernder Belüftung wurden die Karyopsen in Keimröhrchen bei 25–28 °C im Dunkeln zur Keimung gebracht. Die 3–4 Tage alten Keimlinge wurden dann auf Fernbachkolben mit 200 ccm Nährlösung zur eigentlichen Aufzucht umgesetzt.

Da der Wechsel vom heterotrophen Wachstum eines etiolierten Keimlings zur autotrophen, assimilierenden jungen Pflanze für diese zweifellos eine gewisse Umstellung bedeutet, wurden die Keimlinge während 3–4 Tagen in der Nährlösung ohne Zusätze vorkultiviert.

Im weiteren erschien es mir notwendig, vor allem zur Untersuchung der Ionenaufnahme, die nun assimilierenden Jungpflanzen vom Rest der Karyopse zu trennen, um einen weiteren Bezug von Nährstoffen aus der Frucht bei eventueller Blockierung der Fähigkeit der Stoffaufnahme durch die Wurzel auszuschalten; dieses Entfernen erfolgte nach Beendigung der Vorkultur und damit nur kurz vor dem eigentlichen Versuchsbeginn.

Nährlösung

Als Kulturmedium für den Mais diente eine modifizierte Pfeffer-Robbins-Nährlösung mit erhöhtem Eisengehalt (Vöchting, 1953) von folgender Zusammensetzung: 2,0 g $Ca(NO_3)_2$, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g KNO_3, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g KCl und 0,06 g $FeCl_3$ in 6000 ccm entsalztem Wasser.

Die Spurenelemente kamen in Form von 1 ccm je Liter einer «A-Z-Lösung» nach Hoagland (aus Bergmann, 1958, S. 66) zur Nährlösung.

Diese Zusammensetzung ergibt ein Anfangs-pH der Nährlösung von ca. 4. Sämtliche verwendeten Salze waren vom Reinheitsgrade «pro analysi», und alle Lösungen wurden mit durch Ionenaustauscher entsalztem Wasser hergestellt (spezifischer Widerstand ca. 2×10^6 Ohm). Ebenso wurde zur Quellung und Keimung sowie zum Abspülen der Wurzeln beim Abbruch nur solches Wasser verwendet.

In der Folge erwies es sich als notwendig, die angegebene Nährlösung auf ¼ zu verdünnen. Die A-Z-Lösung wurde jedoch weiterhin in ihrem ursprünglichen Gehalt zugesetzt, um Mangelerscheinungen durch zu

geringen Gehalt an Spurenelementen zu vermeiden. Aus derselben Überlegung heraus wurde der Eisenzusatz nur um die Hälfte reduziert.

Strontiumzusatz

Zur Untersuchung der Strontiumaufnahme musste Strontium zur Nährlösung gegeben werden. Dies geschah jeweils im Moment der Antibiotikumzugabe in Form von 1 ccm/Kolben einer Lösung von einem Strontiumgehalt, welcher auf 200 ccm Nährlösung berechnet war. Die dadurch entstandene Verdünnung der Nährlösung konnte vernachlässigt werden.

Der Strontiumgehalt in der Lösung betrug je nach Versuch 5–25 γ/ccm Nährlösung. Die Zusatzlösungen wurden durch Verdünnung aus einer Stammlösung von Strontiumchlorid erhalten, deren Gehalt mittels Zeiss-Eintauchrefraktometer eingestellt wurde (Refraktometerwerte aus Wagner, 1928).

Was die toxische Wirkung von Strontium auf das Wachstum von Mais anbetrifft, so kann auf Läuchli (1962, S. 150) verwiesen werden. Die hier verwendeten Konzentrationen liegen weit unterhalb des toxischen Bereiches.

Antibiotikumzusatz

Verwendet wurden folgende Antibiotika:

Penicillin G (= Benzyl-Penicillin, $C_{16}H_{18}N_2O_4S$)
der Firmen Calbiochem bzw. Pfizer

Penicillin V (=Phenoxymethyl-Penicillin,
$C_{16}H_{18}N_2O_5S$) der Firma Vifor

Streptomycin A ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) der Firmen Calbiochem bzw. Pfizer

Chloramphenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) der Parke-Davis-Company.

Die Zusätze erfolgten in Form von frisch hergestellten, wässrigen Lösungen. Die geforderte Menge Antibiotikum wurde wie das Strontium in einem kleinen, gegenüber der Nährlösungsmenge zu vernachlässigenden Volumen, dessen Konzentration auf 200 ccm Nährlösung berechnet war, zugegeben. Nach erfolgtem Zusatz wies dann die Lösung die geforderte Molarität an Antibiotikum auf.

Bei der Errechnung der Einwaage wurde nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch die definitionsgemäss geforderte Anzahl Einheiten berücksichtigt (Vogel, 1951), um im Endeffekt die Molarität in bezug auf *reines* Antibiotikum zu erhalten.

In höheren Konzentrationen war es, entsprechend der Löslichkeit der Antibiotika, oft unmöglich, die Verabreichung in Form von 1 ccm je Kolben einzuhalten. In solchen Fällen wurde, unter Berücksichtigung gleicher Behandlung sämtlicher Versuchspflanzen, die Vorkultur in weniger als 200 ccm Nährlösung durchgeführt, deren Salzgehalt jedoch auf volles Volumen berechnet war. Nach Zugabe des Antibiotikums in einem entsprechend grösseren Volumen entsprach dann stets die Lösung hinsichtlich Menge, Salzgehalt und Antibiotikumkonzentration den Forderungen.

Im extremsten Falle wurden die Pflanzen nach der Vorkultur auf neue Nährlösung mit direkter Einwaage des Antibiotikums umgesetzt.

In keinem Falle wurde jedoch der Löslichkeitskoeffizient in der Nährlösung überschritten.

Kultivierungsbedingungen

Die Aufzucht erfolgte im Gewächshaus bei einem Temperaturmittel von 25–28 °C und im 14-Stunden-Tag (künstliche Nachbeleuchtung mit Fluoreszenzlampen). Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50–60% und wurde durch Verdunstung von Regenwasser erzielt, um die Sprosse nicht durch Kalkablagerung zu verunreinigen.

Die Aufstellung der Pflanzen im Gewächshaus geschah je nach Art des Versuchs in zufälliger Anordnung oder in «Latin Squares» (Fisher und Yates, 1948).

Kontrolle der Aktivität der Antibiotika

Die Persistenz der antibiotischen Aktivität in der Nährlösung wurde im Lochtestverfahren (Otte, 1965, S. 82) in Petrischalen geprüft. Als Nährboden für den Testorganismus diente Bierwürzeagar (2% Agar-Agar in mit Brunnenwasser auf ⅓ verdünnter Bierwürze).

Testorganismus war *Bacillus subtilis*. Die Entwicklung des Tests geschah im Brutschrank bei 28 °C.

Der Lochtest wurde dem Zylindertest vorgezogen, da er rascher und exakter durchführbar war.

Bei der Durchführung der Teste wurde durch standardisiertes Arbeiten quantitative Auswertbarkeit angestrebt. Es ist verständlich, dass dies nur annähernd getan werden kann, da nebst Konstanz von pH, Temperatur und Suspensionsdichte des Testorganismus, vor allem dessen Vitalität eine Rolle in der Reproduzierbarkeit des Tests spielt.

Dieser Test wurde auch zum qualitativen Nachweis aktiven Antibiotikums im Spross und in der Wurzel der Versuchspflanzen verwendet. Er wurde dazu einzig insofern abgeändert, als zur Aufnahme grösserer Mengen Testlösung eine Rinne in die Platte gegossen wurde (Fig. 2 und 3).

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Bei Abbruch des Versuchs wurden Sprosse und Wurzeln getrennt und separat weiterverarbeitet.

In Hinblick auf eine Bestimmung des Ionengehaltes oder eine Identifizierung von aktivem Antibiotikum im Pressaft war ein rasches, jedoch gutes Waschen der aus der Kulturlösung kommenden Wurzeln Voraussetzung. Anschliessend wurden sie zwischen Filtrierpapier abgeklatscht. Es folgten: Längenmessung und Bestimmung des Frischgewichtes und nach 12stündiger Trocknung bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz die Ermittlung des Trockengewichtes. Zudem wurde stets das Volumen der verbliebenen Kulturlösung und deren pH bestimmt.

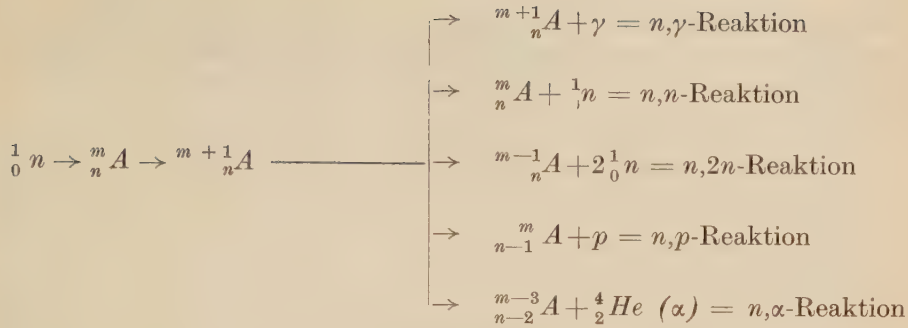
Das getrocknete Material aus gleicher Versuchsbedingung wurde in einer Mikroschlagmühle (Modell Culatti) fein gemahlen und möglichst homogen vermischt. Das so entstandene Pulver wurde in genauen Einwaagen in kleine Röhrchen aus Polyäthylen-Mikroschlauch (Länge 20 mm, Innendurchmesser 2 mm, Wandstärke 1 mm) gefüllt, die wie Ampullen zugeschmolzen wurden. Diese Proben wurden dann im Neutronenfluss aktiviert.

In gleicher Weise wurden Eichproben hergestellt. Das Pflanzenmaterial dazu bestand aus einem «Standardhomogenisat», welches durch eine einmalige Aufzucht speziell zu diesem Zweck gewonnen wurde und dessen Gehalt an den hier interessierenden Ionen bekannt war.

Um bei der Analyse nicht Fehler durch Verunreinigungen zu erhalten, musste der verwendete Mikroschlauch innen und die fertigen Proben aussen peinlich saubergemacht werden. Sogenannte Leerproben (ohne Inhalt) wurden stets mitbestrahlt, um dadurch einen Hinweis auf eventuelle Verunreinigung der Proben zu haben.

Die Aktivierungsanalyse

Bei der Aktivierungsanalyse – welche in dieser Arbeit zur Anwendung kam – macht man sich die Tatsache zunutze, dass bei der Bestrahlung von Substanzen mit Neutronen einige oder alle in ihnen vorhandenen Elemente in ihre radioaktiven Isotope umgewandelt werden. Die Kernumwandlung kann hierbei auf verschiedene Art ablaufen, wie dies aus dem nachfolgenden Schema hervorgeht:



Über die Wahrscheinlichkeit, mit welcher eine der genannten Reaktionen abläuft, gibt der sogenannte Wirkungsquerschnitt σ Auskunft, eine für jedes Element charakteristische Grösse. Im Falle der n,γ- und der $n,2n$-Reaktion werden Isotope des ursprünglich vorhandenen Elements erhalten, während aus der n,p- und n,α-Reaktion Isotope von Elementen mit 1 bzw. 2 Ordnungszahlen niedriger als die Ausgangselemente erhalten werden. Verwendet man thermalisierte Neutronen zur Bestrahlung, so findet hauptsächlich die n,γ-Reaktion statt, während die n,p- bzw. n,α-Reaktionen vor allem mit schnellen Neutronen ablaufen.

Die bei einer Bestrahlung mit Neutronen erzeugte Aktivität lässt sich nach folgender Gleichung errechnen:

$$A_s = \frac{0{,}6 \cdot \Phi \cdot \sigma \cdot f}{3{,}7 \cdot 10^{10} \cdot AG \cdot 100} \left(1 - e^{-\frac{0{,}69 \cdot t}{T}} \right) \text{Curie/g}$$

Hierbei sind:

A_s = spezifische Aktivität in Curie/g
Φ = Neutronenfluss in Neutronen $\cdot$ cm$^{-2} \cdot$ s^{-1}
σ = Wirkungsquerschnitt in barn (10^{-24} cm^2)
f = Häufigkeit eines Nuclids im natürlichen Isotopengemisch in %
AG = Atomgewicht
t = Bestrahlungsdauer
T = Halbwertszeit des entstandenen Isotops

Wie aus dieser Gleichung hervorgeht, findet bereits bei der Bestrahlung eine Vorsortierung der Elemente statt, und zwar nach ihren individuellen Wirkungsquerschnitten und ihren Halbwertszeiten.

Durch geeignete Wahl der Dauer der Bestrahlung und des Neutronenflusses werden bestimmte Elemente stark, andere hingegen nur wenig aktiviert.

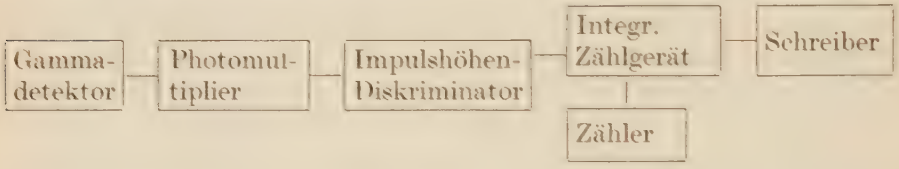
Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Analysenmaterial im «Saphir» sowie im «Diorit» des EIR (Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen, Schweiz) mit einem integrierten Neutronenfluss von $9 \cdot 10^{16}$ bis $1 \cdot 10^{17}$ n.v.t. bestrahlt.

Die bei der Bestrahlung entstandenen Isotope können nun durch 3 Kriterien voneinander unterschieden werden:

1. durch die Art der Strahlung (β oder γ),
2. mittels Halbwertszeit und
3. durch die Energien der emittierten Strahlung.

Die Bestimmung der Gammaenergien wurde unter Verwendung eines «Philips»-Einkanal-Gamma-Szintillationsspektrometers durchgeführt.

Dieses Gerät setzt sich im wesentlichen aus folgenden Teilen zusammen:



Der Gammadetektor besteht aus einem thalliumaktivierten Natriumjodid-Einkristall bzw. einem Bohrlochkristall aus demselben Material.

Dieser Gammaszintillator wird heute allgemein zur genauen Gammaenergiemessung verwendet, da seine Lichtleistung der vom Kristall aufgenommenen Energie in weitem Bereich (bis 6 MeV) proportional ist.

Treffen aus dem Präparat ionisierende Strahlen auf den Szintillator auf, so entstehen Sekundärelektronen, welche im Kristall Lumineszenzerscheinungen auslösen. Die dadurch entstehenden Photonen treffen auf die Photokathode des Multipliers, wo sie Elektronenströme verursachen. Diese Impulse werden verstärkt und der Registrierung und Zählung zugeleitet. Auf ihrem Weg durchlaufen die Impulse den Impulshöhen-Diskriminator, welcher nun nur diejenigen Impulse durchlässt, deren Energie grösser ist als eine bestimmte, wählbare Spannung (= untere Diskriminatorspannung). Andererseits werden ebenfalls sämtliche Impulse mit höherer Energie als eine gewählte obere Diskriminatorspannung abgeschirmt. Wird nun die Diskriminatorspannung kontinuierlich verändert, bei einer frei wählbaren Fenster-(oder Kanal-)Breite (= obere D.Sp. minus untere D.Sp.) von z. B. 1 V, so entsteht ein Gammaspektrum (im Beispiel der Gammamessung), welches für eine bestimmte Analysenprobe charakteristisch ist und analysiert werden kann (Fig. 1).

Figur 1

Gammaspektrum einer Sprossprobe von *Zea Mays*

Laufzeit des Spektrums:	14 min
Logarithmische Abschwächung:	1,500
Kanalbreite:	1 V
Eichung mit Co-60	
Pfeil = Empfindlichkeitsänderung	

Jedes radioaktive Isotop besitzt eine für dieses spezifische Strahlungsenergie, welche in linearer Beziehung zu dessen Impulshöhe steht. Durch diese Gesetzmässigkeit lässt sich ein Spektrum mit Hilfe von Isotopen, deren Gammaenergien bekannt sind, eichen, die Energien für die aufge-

fundenen Maxima und somit die Isotope, für welche diese Maxima charakteristisch sind, bestimmen.

Durch Veränderung der Empfindlichkeit des Verstärkers oder der Spannung am Photomultiplier verändert sich die Höhe der Einzelimpulse und damit die Lage der Maxima. Auf diese Weise lässt sich ein Spektrum mit dicht aufeinanderfolgenden Maxima spreizen, wodurch letztere zur besseren Unterscheidung voneinander getrennt werden können.

Ist ein Isotop durch seine Gammaenergie identifiziert, so kann die Konzentration des betreffenden Elements in der Analysenprobe bestimmt werden. Diese Bestimmung geschieht durch Messung der Impulsraten der für ein Isotop charakteristischen Emission unter Berücksichtigung seiner Zerfallsdaten.

Um eine Aktivierungsanalyse mit vernünftiger Genauigkeit durchführen zu können, ist es notwendig, eine Eichsubstanz von ähnlicher Zusammensetzung wie die zu analysierende Probe unter gleichen Bedingungen, sowohl in der Bestrahlung wie auch in der Messung, mitzuverarbeiten. Der Neutronenfluss innerhalb einer Bestrahlungseinheit (Reaktor) ist nur begrenzt homogen und nicht genau messbar, so dass die entstandene Aktivität nicht mit genügender Genauigkeit aus der obgenannten Gleichung errechnet werden kann. Ausserdem wird der Fluss innerhalb einer Probe durch verschiedene Faktoren (z.B. Selbstabschirmung) beeinträchtigt. Es würden also grosse Fehler entstehen. Bestrahlt man jedoch Eichproben gleichzeitig mit den Analysenproben, so lässt sich aus den Messwerten für die Eichproben einfach und mit ausreichender Genauigkeit auf die Analysenprobe rückrechnen.

Die genannten Argumente gelten auch für die Messung selbst.

Der Elementgehalt wird bei Vergleich mit Eichproben nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{N_{ap}}{N_{ep}} = \frac{\text{gesuchte Konzentration}}{\text{Konzentration in } EP}$$

wobei N_{ap} = in n Sekunden gemessene Impulszahl der Analysenprobe und N_{ep} = in n Sekunden gemessene Impulszahl der Eichprobe *(EP)*.

Damit die einzelnen Werte und Werte aus verschiedenen Proben überhaupt miteinander vergleichbar sind, müssen selbstverständlich 2 Faktoren berücksichtigt werden, bei vorausgesetzter gleicher Bestrahlung und gleichen Messzeiten.

1. Die Halbwertszeit. Zwei Messungen, welche zu verschiedenen Zeiten gemacht werden, sind nur bei Umrechnung auf eine gemeinsame Zeit t_o vergleichbar.

Nach dem Zerfallsgesetz ist:

$$N_t = N_o \cdot e^{-\lambda t}$$

wobei die Zerfallskonstante λ für ein Isotop spezifisch ist. In der Folge wurden die Zerfallskurven für die zu bestimmenden Elemente aufgestellt, aus denen die Werte $e^{-\lambda t}$ für eine beliebige Zeit t abgelesen werden konnten und sämtliche Analysenwerte auf eine gemeinsame Zeit t_o mit Hilfe des Zerfallsgesetzes umgerechnet.

2. Auch die Einwaagen der Analysenproben müssen vergleichbar sein. Aus diesem Grunde wurden sämtliche Werte auf eine gemeinsame Gewichtseinheit (Milligramm Trockengewicht) umgerechnet.

Die vollständige Formel zur Ermittlung untereinander vergleichbarer Konzentrationen mit Hilfe der gemessenen und auf t_o umgerechneten Impulszahlen N_o lautet demnach:

$$\left(\begin{array}{c}\text{Elementgehalt}\\ \text{pro mg TG}\end{array}\right)_{ap} = \frac{\left(\frac{N_o}{\text{mg TG}}\right)_{ap} \cdot \left(\frac{\text{bekannter Gehalt}}{\text{mg TG}}\right)_{ep}}{\left(\frac{N_o}{\text{mg TG}}\right)_{ep}}$$

Die Methode der Aktivierungsanalyse wurde in meiner Arbeit gewählt, da sie gegenüber anderen Analysenmethoden eine komplizierte Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials umgehen lässt, wodurch eine Häufung von Fehlerquellen vermieden werden kann.

Zudem kann sie als empfindlich und genau angesprochen werden.

Eine Limite-Errechnung mittels der spezifischen Aktivität könnte nur ungefähr gemacht werden, da der Neutronenfluss nur annähernd geschätzt werden kann. Ebenso ist die Ansprechwahrscheinlichkeit des Spektrometers, welche in die Rechnung ebenfalls eingeht, nur in grossen Grenzen abschätzbar. Aus diesen Gründen wurden die Bestimmungslimiten mit Hilfe der Messwerte der Eichproben errechnet. Unter der Annahme, dass 100 Impulse/min notwendig sind, um das Isotop identifizieren zu können, ergeben sich folgende Limiten: Kalium ca. 5 Gamma, Calcium ca. 0,2 Gamma und Strontium ca. 2 Gamma.

Die Limite für Kalium kann jedoch hier nicht als absolut angesehen werden; wurde doch Kalium mit einem Normalkristall, Calcium und Strontium hingegen im geometrisch besseren Bohrlochkristall bestimmt. Somit dürfte die absolute Grenze für die Kaliumbestimmung etwa um einen Faktor 50 bis 100 tiefer liegen.

Die Genauigkeit der Messungen liess sich aus den Analysen mit ca. $\pm 2\%$ für Kalium, ca. $\pm 3\%$ für Calcium und ca. $\pm 4{,}5\%$ für Strontium bestimmen.

Statistische Sicherung der Resultate

Da der Umfang der einzelnen Versuche zu gross war (10 Pflanzen pro Bedingung), um jede Kultur einzeln verwerten zu können, mussten Pflanzen gleicher Bedingung gesamthaft analysiert werden. Um dennoch ein Mass für die Streuung der Mittelwerte zu erhalten, wurden verschiedene Versuche so angelegt, dass aus ihnen die Streuung der Mittelwerte $\sigma_{\bar{x}}$ für das Wachstum (Länge der Pflanzen bzw. Trockengewicht) und die Ionenaufnahme ermittelt werden konnte. Die derart errechneten Streuungen dienten im weiteren der statistischen Auswertung. Sie geschah durch Mittelwertsvergleich nach dem *t*-Test (Fisher, 1946, S. 122ff.).

War die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ($P < 0{,}05$), wurde Signifikanz angenommen.

In der Arbeit werden nur signifikante Unterschiede diskutiert.

Versuche und Resultate

Voruntersuchungen

Stabilität der Antibiotika in einer Pfeffer-Robbins-Nährlösung

Die Haltbarkeit eines Antibiotikums bzw. dessen Wirkung wird nicht nur in natürlichen Böden durch die verschiedensten Faktoren, wie Abbau durch andere Mikroorganismen, pH und chemische Zusammensetzung des Bodens, beeinflusst, sondern auch in synthetischen Nährmedien mehr oder weniger stark herabgesetzt (Abraham und Duthie, 1946; Donovick et al., 1948).

Penicillin G wird selbst in kristallinem Zustand relativ rasch inaktiv. In Lösung ist die Haltbarkeit noch um einen beachtlichen Faktor verkürzt.

Bei der Durchführung von Untersuchungen über die Einflüsse von Antibiotika auf das Wachstum und auch die Ionenaufnahme war es daher wichtig, vorerst abzuklären, wie es um die Stabilität der zur Verwendung gelangenden Antibiotika in der vorgelegten Nährlösung bestellt ist.

Die Stabilitätsverhältnisse wurden daher im Plattentest ermittelt. Es wurden je Antibiotikum mehrere Kolben mit Pfeffer-Robbins-Nährlösung bereitgestellt und mit den zu testenden Antibiotika versetzt. Die Konzentration wurde derart gewählt, dass im Plattentest gut messbare Hemmzonen entstanden.

An jedem Testtage wurden den Kolben aliquote Volumina entnommen und zur Bildung eines «Mittelwertes» zusammengegeben. Zudem lief an

jedem Tage und auf jeder Platte eine Standardlösung (frisch hergestellte Lösung von Penicillin G) als Kontrolle mit.

Tabelle 1

Stabilität von Penicillin G, Penicillin V, Streptomycin und Chloramphenicol in der Pfeffer-Robbins-Nährlösung

Standard = frische Lösung von Penicillin G
HZD = Hemmzonendurchmesser in Millimeter
T/S = Vergleichswert (Test-HZD: Standard-HZD)
angegeben sind stets Mittelwerte aus 10 Platten

Test-datum Tage	Standard	Penicillin G		Penicillin V		Streptomycin		Chloram-phenicol
	HZD	HZD	T/S	HZD	T/S	HZD	T/S	HZD
0	23,75	22,95	0,97	25,20	1,06	17,68	0,75	20,15
1	19,55	13,55	0,69	20,85	1,07	20,05	1,03	21,85
2	17,65	8,60	0,49	18,25	1,03	16,65	0,94	19,90
3	19,95	0,00	—	19,60	0,98	17,65	0,89	21,55
4	19,80			19,50	0,98	17,95	0,91	20,81
5	22,55			21,00	1,07	22,65	1,01	20,63
6	21.20			20,05	0,95	22,45	1,06	21,18
7	19.30			18,35	0,95	22,20	1,15	19,89
8	17,80			17,40	0,98	19,25	1,08	20,65
9	17,95			16,85	0,94	21,30	1,19	19,55
10	19,70			17,50	0,89	18,05	0,92	19,62
36	17,50			10,35	0,59	17,20	0,98	

Bei Chloramphenicol sind keine T/S-Werte angegeben, da diese Teste zu späterer Zeit in separater Serie stattfanden

Die Resultate (Tab. 1) zeigen, dass die antibiotische Wirkung von Penicillin G innert 24 Stunden stark abnimmt und nach 3 Tagen für den Test unmessbar klein wird. Aus diesem Grunde musste für die Versuche an Stelle von Penicillin G Penicillin V verwendet werden, dessen Wirkung im Vergleich zu Penicillin G gleichwertig ist. Dieses Antibiotikum sowie Streptomycin und Chloramphenicol behalten ihre Aktivität während einer Versuchsperiode praktisch unverändert bei.

Die Schwankungen der Mittelwerte konnten trotz gleichmässiger Herstellung der Teste unter konstanten Bedingungen nicht verhindert werden. Ihre Ursache liegt vor allem darin, dass die Beimpfung der Platten mit *Bacillus subtilis* nur annähernd quantitativ kontrollierbar ist.

Bestimmung der toxisch wirkenden Dosis

Ferner musste abgeklärt werden, in welcher Konzentration diese Antibiotika für das Wachstum der Pflanze toxisch zu wirken beginnen.

In Untersuchungen des Wachstums und der Ionenaufnahme interessiert natürlich vor allem der nichttoxische Bereich, da bei einer Schädigung Veränderungen im vornherein erwartet werden dürften. Jedoch schien mir die Untersuchung des toxischen Bereiches nicht weniger interessant.

Ein Erkennen der toxischen Konzentration ist jedoch – wie die diesbezüglichen Versuche zeigten – nicht unbedingt leicht, denn die schädigende Wirkung erscheint in verschiedenen Formen, wie Hemmung der Wurzel- und Sprossausbildung sowie der Chlorophyllsynthese. Diese

Tabelle 2

Zea Mays: Antibiotikumeinfluss auf die Ausbildung von Spross und Wurzel in Abhängigkeit vom Alter der Keimpflanze im Moment der Antibiotikumzugabe

Antibiotikum:	Streptomycin
Wachstum der Pflanzen mit Antibiotikum:	13 Tage
Nährlösung pro Kolben:	200 ccm
Temperaturmittel:	25 °C
Mittlere relative Luftfeuchtigkeit:	50–60 %
Tageslänge:	14 Stunden

A = 4 Tage Keimung und 4 Tage Vorkultur
B = 3 Tage Keimung und 1 Tag Vorkultur
Umfang der Stichprobe: je 5 Pflanzen

	Antibiotikum-konzentration molar	im Vergleich zur Kontrolle			
		Spross		Wurzel	
		A	B	A	B
Längenwachstum	10^{-5}	etwas gefördert	reduziert	gleich	reduziert
	10^{-4}	schwach reduziert	stark reduziert	reduziert	stark reduziert
	10^{-3}	stark reduziert		stark reduziert	
Trockengewicht	10^{-5}	etwas gefördert	reduziert	gleich	reduziert
	10^{-4}	schwach reduziert	reduziert	reduziert	stark reduziert
	10^{-3}	reduziert		stark reduziert	
Hemmung der Chlorophyllbildung	10^{-5}	keine	schwach		
	10^{-4}	schwach	stark		
	10^{-3}	stark			

Symptome treten bei steigender Antibiotikumkonzentration in mehr oder minder fliessendem Übergang auf, selbst dann, wenn die Konzentrationen in Zehnerpotenzen variiert werden, wie dies in den Versuchen geschah. Die angewendeten Konzentrationen waren für alle Antibiotika 10^{-7}-, 10^{-6}–, 10^{-5}–, 10^{-4}– sowie 10^{-3}molar. Zudem wurde aus einem interessanten Befund heraus, welcher im Abschnitt über die Beeinflussung der Pigmentsynthese erläutert wird, noch die Konzentration $5 \cdot 10^{-4}$molar in die Reihe eingeschoben.

Es zeigte sich, dass sowohl bei Penicillin als auch bei Streptomycin und Chloramphenicol das äusserliche Auftreten von Toxizitätserscheinungen praktisch in die gleiche Konzentration fällt. Bei Berücksichtigung des fliessenden Überganges konnten nur die Konzentrationen M 10^{-7}, 10^{-6} und 10^{-5} als nichttoxisch bezeichnet werden. Bei den höchsten Konzentrationen (M $5 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-3}) waren alle Symptome einer Schädigung vorhanden. In noch höherer Dosis liessen sich die Pflanzen nicht mehr für die Dauer einer Versuchsperiode von 10–14 Tagen halten. Hier war also die Letalgrenze erreicht.

Tabelle 3

Zea Mays: Einfluss der Dauer der Antibiotikumexposition auf das Wachstum und die Chlorophyllbildung

Antibiotika:	Penicillin G bzw. V
Alter der Pflanzen bei Antibiotikumzugabe:	6 Tage
Wachstum der Pflanzen mit Antibiotikum:	14 Tage
Nährlösung pro Kolben:	200 ccm
Temperaturmittel:	25 °C
Mittlere relative Luftfeuchtigkeit:	50–60 %
Tageslänge:	14 Stunden

Mittelwerte aus 5–8 Pflanzen

	Antibiotikum-konzentration molar	% im Vergleich zur Kontrolle			
		Spross		Wurzel	
		Penicillin G	Penicillin V	Penicillin G	Penicillin V
Länge (cm)	10^{-5}	0,0	+ 1,0	—18,7	—26,3
	10^{-4}	—7,9	+ 4,0	—35,3	—20,4
	10^{-3}	—9,1	—44,4	—22,4	—64,4
Hemmung der Chlorophyll-bildung	10^{-5}	keine	keine		
	10^{-4}	keine	stark		
	10^{-3}	keine	stark		

Bei welcher Konzentration die ersten Symptome auftreten, hängt im wesentlichen vom Alter ab, welches die Pflanze im Moment der Anti-

biotikazugabe erreicht hat. (Als erstes Symptom möge das sichtbare Ausbleichen gewisser Blattpartien definiert sein.) Auch in Länge und Trokkengewicht zeichnet sich eine solche Abhängigkeit ab (Tab. 2).

Im weiteren spielt selbstverständlich die Dauer der Antibiotikumeinwirkung eine grosse Rolle. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch kann im Vergleich der Wirkungen von Penicillin G und Penicillin V eine Bestätigung gefunden werden (Tab. 3). Verliert doch, wie bereits dargelegt, das Penicillin G seine antibiotische Wirkung sehr rasch, während Penicillin V stabil bleibt.

Einfluss des Entfernens der Karyopsen auf die Empfindlichkeit der Pflanzen gegenüber Antibiotikawirkungen

Das Entfernen der Karyopsenreste von der Keimpflanze hatte allgemein eine Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge. Das Auftreten der ersten Erscheinungen der Antibiotikumwirkung wurde dadurch jedoch nicht in eine niedrigere Konzentration verschoben.

Einzig konnte beobachtet werden, dass sich Pflanzen, denen die Karyopse gelassen wurde, etwas länger in den 10^{-3}molaren Antibiotikalösungen halten liessen.

Antibiotikumzusatz und dadurch resultierende pH-Verschiebungen in der Nährlösung

Eine wichtige Voraussetzung ist eine möglichst parallele pH-Veränderung in den Nährlösungen verschiedener Bedingungen. Ist diese Forderung nicht gegeben, so ist es klar, dass verschiedenes Wachstum bzw. unterschiedliche Ionenaufnahme nicht unbedingt auf die Wirkung der Antibiotika zurückgeführt werden dürfen.

In der verwendeten Nährlösung beträgt das Anfangs-pH ca. 4. Während einer dreiwöchigen Kultivierung von Mais *ohne* Zusätze steigt das pH auf etwa 7. Diese normale pH-Änderung lässt sich in einer unverdünnten Pfeffer-Robbins-Nährlösung auch bei Antibiotikumzusatz von sogar 10^{-3}molar annähernd beibehalten.

In den Versuchen mit verdünnter Nährlösung reichte jedoch die Pufferwirkung nicht mehr aus, in den höchsten Konzentrationen das pH auf einem der Kontrolle gleichen Wert zu halten.

Die Verdünnung der Nährlösung war nötig, um die Kalium- und Calciumkonzentration herabzusetzen, da sonst eventuelle Effekte in der Aufnahme dieser Ionen – infolge einer gewissen Sättigung der Pflanze – nur schwer zu erkennen sind (vgl. Frei, 1963, S. 50).

Durch diese Verdünnung fällt aber auch der Phosphatgehalt und damit die Pufferkapazität. Ein Ersatz durch Natriumphosphat wäre ungünstig gewesen, weil dadurch in der Aktivierungsanalyse mit einem Natriumpegel gerechnet werden müsste, welcher sich nachteilig auf die Bestimmungen von Kalium und Calcium ausgewirkt hätte. Der verminderte Ionengehalt hingegen hatte auf das Wachstum der Pflanzen während der relativ kurzen Kultivierungsdauer keinen merklichen Einfluss.

Zur Beurteilung der Resultate musste daher die Beeinflussung von Wachstum und Ionenaufnahme durch pH-Unterschiede abgeklärt werden.

Eine nur geringfügige Verschiebung im End-pH, wie sie für Streptomycin und Chloramphenicol zu verzeichnen war (grösste Differenz gegenüber Kontrolle: 1 pH-Stufe), darf im vornherein unberücksichtigt bleiben. Aber auch die grössere Differenz in Penicillinversuchen (3 pH-Stufen d.h. Kontrolle: pH ca. 7 bzw. 10^{-3} M: pH ca. 4) dürfte nicht als effektives Moment in Frage kommen.

Aus den Untersuchungen von Läuchli (1966, Tab. 4) ergibt sich, dass das Trockengewicht von Mais, welcher bei pH 4 gewachsen ist, gegenüber jenem aus Nährlösungen von pH 6,5 nicht verschieden ist. Zudem zeigt die Ionenaufnahme bei Mais ebenfalls keine signifikante pH-Abhängigkeit (Läuchli, 1966).

Nachweis aufgenommener Antibiotika in Wurzel und Spross

Eine Beeinflussung des Stoffwechsels und damit des Wachstums der Pflanze ganz allgemein wird vor allem dann statthaben, wenn das betreffende Antibiotikum in die Wurzel aufgenommen und in den Spross transportiert wird und selbst im Pflanzenkörper noch seine antibiotische Wirkung beibehält. Bei eventueller Desorganisation des Moleküls könnten natürlich auch dessen Bruchstücke eine Wirkung auf die Pflanze ausüben. Die Frage, ob Antibiotika von höheren Pflanzen aufgenommen werden, ist bereits verschiedentlich untersucht worden; Mitteilungen darüber finden sich für Aureomycin (Blanchard und Diller, 1951), Griseofulvin, Streptomycin und Chloramphenicol (Brian et al., 1951; Crowdy, 1957; Mitchell et al., 1952, 1954; Ovsyannikova, 1965) wie auch für Penicillin (Winter und Willeke, 1951; Winter, 1952) und Tetracyclin (Alcorn und Ark, 1956).

Die Aufnahme bzw. die Menge, welche aufgenommen wird, hängt ab von der Dauer der Einwirkung und der Konzentration in der Vorlage (Dye, 1956; Pramer, 1954), aber auch von Temperatur, pH, Ionenzusammensetzung der Lösung, Anwesenheit von Atmungshemmstoffen und verschiedenen Wachstumsregulatoren, was nicht zuletzt auf einen

aktiven Aufnahmeprozess schliessen lässt (Goodman und Dowler, 1958; Goodman und Goldberg, 1960; Litwack und Pramer, 1957; Pramer, 1956).

Da aus diesen Gründen eine Aufnahme der Antibiotika bei bestimmter Versuchsanordnung nicht im vornherein angenommen werden kann, wurde beiläufig versucht, auf verschiedene Weise in den aufgezogenen Pflanzen aktives, aus der Nährlösung aufgenommenes Antibiotikum nachzuweisen.

Die diesbezüglichen Versuche umfassten:

1. die Untersuchung von Guttationstropfen im Plattentest;
2. die Untersuchung des Pressaftes zerriebener Sprosse und Wurzeln im Plattentest;
3. die Untersuchung des Pressaftes im Papier- bzw. Dünnschichtchromatogramm (nach Horne und Pollard, 1948; Linskens, 1959; Stahl, 1962).

Ein chromatographischer Nachweis gestaltet sich nicht ganz einfach, da es sich bei einem Pflanzenpressaft um ein komplexes Analysengut handelt. Dazu kommt, dass der Pressaft relativ wenig Antibiotikum enthält; dürfte letzteres doch zum Teil an gewisse Strukturen gebunden und nur mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar sein (Crowdy und Pramer, 1955).

Einzig Chloramphenicol liess sich im Papierchromatogramm mit dem Nitrotest (Linskens, 1959, S. 308) im Wurzelpressaft nachweisen. Über den Zustand der Aktivität lässt zudem ein Chromatogramm höchstens bei anschliessender mikrobiologischer Entwicklung eine Aussage machen, da oft auch gewisse Gruppen des abgebauten, inaktiven Moleküls ähnliche Reaktionen mit ähnlichen R_f-Werten ergeben (Linskens, 1959, S. 305). Zur mikrobiologischen Entwicklung ist jedoch wiederum eine gewisse Anreicherung der Substanz im Chromatogramm notwendig. Auch eine Identifizierung im Plattentest musste, wie sich bald zeigte, mit Vorsicht gemacht werden.

Schon in alter Zeit wurden die verschiedensten Pflanzen in der Medizin zu Heilzwecken verwendet. Der Erfolg war wohl unbewusst zum Teil dem Gehalt an antibiotisch wirksamen Substanzen zuzuschreiben. Heute liegen zahlreiche Nachweise solcher Substanzen aus Pflanzen praktisch aller Organisationsstufen vor. So zum Beispiel aus Algen und Moosen (Wolters, 1964), vor allem aber aus Vertretern der höheren Pflanzen (Carlson et al., 1946, 1948; Duquénois, 1955; Duquénois und Schaelderlé, 1958; Kovacs, 1964; Nickell, 1959; Winter und Willeke, 1951a, 1952a, b).

Auch während der Untersuchungen des Pressaftes im Plattentest konnten hier solche antibiotischen Stoffe aufgefunden werden. Zeigte doch der Pressaft aus Sprossen etwa 3 Wochen alter Maispflanzen eine schwach hemmende Wirkung auf das Wachstum von *Bacillus subtilis*. (Allerdings war bei 24stündiger Inkubation des Tests die Hemmzone stets leicht vom Testorganismus überwachsen) (Fig. 2, K–S). Diese Tatsache musste bei der Beurteilung der Testergebnisse einkalkuliert werden, welche in den Figuren 2 und 3 abgebildet sind. Im Spross konnten, wie eine Begutachtung der Platten zeigt (Fig. 2), alle 3 Antibiotika als in aktiver Form vorhanden gefunden werden: Chloramphenicol (C3S) durch eine gegenüber der Kontrolle (K-S) stärker ausgeprägte Hemmzone und Penicillin (P3S) sowie Streptomycin (S3S) durch eine Zone totaler Hemmung des Testorganismus innerhalb der durch pflanzeneigene Stoffe bedingten Hemmzone (Pfeile!).

Im Falle des Tests der Wurzelpressäfte waren die Nachweise ebenfalls positiv und zudem eindeutig, da in der Kontrolle keine Hemmung zu verzeichnen war (Fig. 3). Einzig der Nachweis von Streptomycin ist hier nicht ganz augenfällig, da *Bacillus subtilis* nicht sehr empfindlich gegen dieses Antibiotikum ist. Aber auch dieser Test darf entsprechend der geringen, jedoch scharf ausgeprägten Hemmzone (Pfeile!) positiv bewertet werden.

Im Guttationswasser konnte nur Chloramphenicol in aktiver Form nachgewiesen werden. Vermutlich war nur hier die Konzentration genügend hoch, um noch die Hemmung von *Bacillus subtilis* zu bewirken.

Die Ergebnisse, gesamthaft gesehen, gestatten demnach die Aussage, dass sowohl Penicillin wie auch Streptomycin und Chloramphenicol unter den gegebenen Versuchsbedingungen von Maispflanzen via Wurzel aufgenommen und in den Spross verfrachtet werden und zudem selbst im pflanzlichen Organismus noch antibiotisch aktiv sind. Das bedeutet, dass Effekte der genannten Antibiotika auf das Wachstum und auf die Ionenaufnahme nicht nur durch eine äussere Kontaktwirkung mit dem Wurzelsystem erfolgen werden, sondern vielmehr durch ihre direkte Effektivität in den pflanzlichen Organen.

Hauptuntersuchungen

Die Beeinflussung der Pigmentbildung

Die Mitteilungen in der Literatur über die Hemmung der Pigmentbildung – insbesondere der Chlorophyllsynthese – durch Antibiotika beschränken sich fast ausschliesslich auf die Wirkung von Streptomycin (Literatur s. Einleitung).

Im Laufe dieser Arbeit konnten ebenfalls solche Wirkungen auf die Pigmentproduktion beobachtet werden, und die Ergebnisse mögen hier an den Anfang aller festgestellten Effekte gestellt werden, da diese Pigmentblockierung eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Veränderungen im Wachstum spielen dürfte.

Es konnte festgestellt werden, dass alle drei verwendeten Antibiotika in gleicher oder zumindest ähnlicher Weise die Chlorophyllbildung beeinflussen, trotzdem sie, entsprechend ihrer chemischen Struktur, verschiedenen Stoffgruppen angehören.

Aus Untersuchungen über die Wirkungsweise auf Bakterien ist Penicillin als spezifischer Inhibitor der Zellwandsynthese bekannt (Rogers und Jeljaszewicz, 1961; Strominger und Tipper, 1965), während Chloramphenicol als spezifisch die Proteinsynthese hemmend gilt (Weisberger und Wolfe, 1964) und ebenso auch Streptomycin als dieselbe beeinflussend angesehen werden muss (Hurwitz, 1965; Parthier, 1965).

Die Frage nach Verallgemeinerung auch auf höhere Pflanzen ist heute noch umstritten. Es dürfte wahrscheinlich sein, dass alle 3 Antibiotika in irgendeiner Weise die Proteinsynthese beeinflussen.

Was die Hemmung der Chlorophyllbildung anbetrifft, lassen sich bei genauer Beobachtung des zeitlichen Verlaufs wohl gewisse Unterschiede bei den untersuchten Antibiotika feststellen.

Im gesamten betrachtet, kann festgestellt werden, dass eine Wirkung erst in Konzentrationen über ca. 10^{-5} M sichtbar wird. Mit zunehmender Konzentration tritt sie dann mehr und mehr in Erscheinung. Dabei zeigt sich deutlich eine graduelle Zunahme der Wirkung, da bei schwach hemmender Dosis des Antibiotikums die Blätter hellgrün werden und bei starker Hemmung gelb bis weiss erscheinen.

Viel auffälliger jedoch ist die partielle Wirkung, weil nicht das ganze Blatt oder gar die ganze Pflanze chlorophyllos wird, sondern nur die vom Moment der Antibiotikumzugabe weg neu entstehenden Organe oder Organteile. Dadurch sind stets Blätter zu finden, welche spitzenwärts kräftig grün, sonst aber total ausgebleicht sind (Fig. 4 und 5).

Die Hemmung der Chlorophyllbildung scheint sich also in der Blattfolge von der Blattbasis zur -spitze hin auszubreiten. Diese Beobachtung steht in völligem Einklang mit Resultaten von Euler (1953), Euler und Stein (1955) und Sato (1959), welche zur Erkenntnis führten, dass bereits *vor* der Antibiotikumzugabe ausgebildetes Chlorophyll nicht abgebaut wird, sondern unbeeinflusst bestehen bleibt.

Interessanterweise erscheint nun aber diese partielle Hemmung nicht mit allen 3 Antibiotika in gleicher Lokalisation, sondern es lässt sich bei Chloramphenicol eine merkliche Abweichung feststellen.

Während bei Penicillin und Streptomycin eine gleichmässige Ausbleichung der Blattfläche (abgesehen vom chlorophyllhaltigen Endabschnitt) erfolgt, zeigt sich bei Chloramphenicolwirkung eine Lokalisation auf die Mittelrippe und die parallellaufenden Nerven, so dass eine längsgerichtete Zeichnung entsteht (Fig. 5). Dieses Bild ändert sich auch in höherer Konzentration nicht, zumal mit 10^{-3} M der Übergang zur letal wirkenden Dosis erreicht ist.

Bei Penicillin konnte ein weiterer, sehr interessanter Effekt festgestellt werden.

Werden Maispflanzen aufgezogen, ohne dass die Karyopsenreste entfernt werden, so zeigt sich, dass unter der Wirkung von 10^{-4}molar Penicillin eine Hemmung der Chlorophyllsynthese statthat (Fig. 4), bei einer Dosis von 10^{-3} M jedoch nicht (Fig. 5), obwohl weitere Hemmungen im Spross, vor allem aber in der Wurzel klar zutage treten (Fig. 6 und 7).

In einem identischen Versuch wurde zudem die Penicillindosis $5 \cdot 10^{-4}$ M mit untersucht; diese Konzentration erwies sich als etwas stärker pigmenthemmend als 10^{-4} M. Im übrigen erwies sich der 10^{-3}-M-Effekt als reproduzierbar.

Im Laufe der weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass derselbe Effekt auch in Pflanzen, deren Karyopsenreste entfernt wurden, entsteht, wenn auch in etwas weniger eklatanter Weise.

Ganz allgemein wurde der Eindruck gewonnen, dass hinsichtlich des Ausbleichungsgrades bei allen 3 Antibiotika in der Konzentration 10^{-3} M eine gewisse «Besserung» entsteht. Erstaunlicherweise also daselbst, wo die für die Pflanze letal wirkende Dosis praktisch erreicht ist. Im Vergleich zum Wachstum könnte diese «Besserung» daher rühren, dass infolge noch stärkerer Wachstumshemmung die Ausbleichung weniger in Erscheinung tritt, weil damit der relative Anteil der *grünen* Blattfläche, deren Chlorophyll vor der Antibiotikawirkung gebildet wurde, zur *gesamten* Blattfläche grösser würde.

Diese Betrachtungsweise dürfte jedoch auszuschliessen sein, da im Konzentrationsbereich 10^{-4}- bis 10^{-3}molar das Wachstum vom Moment des Beginns der Antibiotikumwirkung an – insbesondere durch Streptomycin und Chloramphenicol – praktisch abgestoppt wird (vgl. Fig. 8).

Der Einfluss auf das Wachstum

Unter der Wirkung von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol können je nach Konzentration dieser Antibiotika merkliche Änderungen im Wachstum festgestellt werden. Diese kommen sowohl im Längenwachstum, bzw. der Zuwachsrate, wie auch im Trockengewicht zum Ausdruck.

Im grossen ganzen darf wohl von einer Hemmung gesprochen werden, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben ist (Bein et al., 1947; Bandi, 1957; Nooden und Thimann, 1963; Weihe, 1953).

Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch bald, dass dieser hemmende Effekt nicht über den ganzen zur Untersuchung gelangten Konzentrationsbereich verallgemeinert werden kann. In den höheren Konzentrationen – insbesondere in jenen, wo die Pigmenthemmung statthat – konnte eine Hemmung des Wachstums bestätigt werden. Zusätzlich jedoch konnte für geringe Dosen – also für jene, welche auf die Pigmentbildung noch ohne Einfluss bleiben – sogar eine Wachstumsstimulation angegeben werden.

Beeinflussung des Längenwachstums

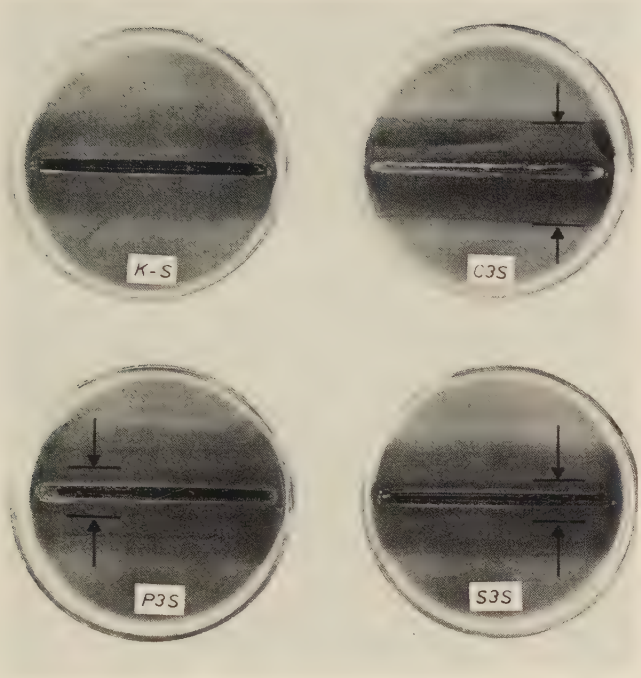
Bereits in den photographischen Abbildungen (Fig. 4, 5, 6 und 7) kommt zum Ausdruck, dass eine deutliche Unterscheidung in der Wirkungsintensität der 3 Antibiotika gemacht werden kann. Während Streptomycin und Chloramphenicol, insgesamt betrachtet, das Wachstum der Pflanze stark beeinflussen, zeigt Penicillin im Vergleich dazu eine geringere Wirkung.

Diese Feststellung betrifft sowohl die Beeinflussung des Wachstums der Wurzel als auch des Sprosses, und sie lässt sich parallelisieren mit der geringeren medizinischen Giftigkeit von Penicillin gegenüber Streptomycin oder Chloramphenicol.

Betrachtet man die Effekte in den verschiedenen Konzentrationen, so zeigt sich deutlich, dass Penicillin über den ganzen untersuchten Bereich die Wachstumsrate nicht wesentlich verändert (ausgenommen in der stärksten Konzentration). Die Wurzel wird zunehmend in ihrem Wachstum gehemmt, jedoch in schwächerem Ausmass als bei den beiden anderen Antibiotika (Fig. 8).

Streptomycin und Chloramphenicol bewirken ein mehr oder weniger identisches Bild mit einer fördernden Beeinflussung des Längenwachstums in nichttoxischen bzw. hemmenden in toxischen Konzentrationen.

Die Kurvenpunkte (Fig. 8) sind jeweils Mittelwerte der absoluten Länge von Spross bzw. Wurzel bei Versuchsabbruch. Um ein Bild vom eigentlichen Längenzuwachs während der Versuchsperiode unter Antibiotikawirkung zu erhalten, ist zu berücksichtigen, dass die Keimpflanzen im Moment der Antibiotikumgabe durchschnittlich sowohl eine Sprosswie auch eine Wurzellänge von 10 cm aufwiesen; es zeigt sich dabei, dass dieser Zuwachs in den höchsten Konzentrationen sehr gering ist. Von einer Sistierung des Wachstums kann aber nicht gesprochen werden; ist



Figur 2

Zea Mays: Nachweis der gebotenen Antibiotika im Sprosspressaft

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-3} M
K-S = Kontrolle
C3S = Chloramphenicolnachweis
P3S = Penicillinnachweis
S3S = Streptomycinnachweis
Pfeile s. Erklärung im Text (S. 229)

Figur 3

Zea Mays: Nachweis der gebotenen Antibiotika im Wurzelpressaft

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-3} M
K-W = Kontrolle
C3W = Chloramphenicolnachweis
P3W = Penicillinnachweis
S3W = Streptomycinnachweis
Pfeile s. Erklärung im Text (S. 229)

Figur 4

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Sprosswachstum und die Chlorophyllbildung

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-4} M

Von links nach rechts:
Kontrolle
Chloramphenicolwirkung
Penicillinwirkung
Streptomycinwirkung

Figur 5

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Sprosswachstum und die Chlorophyllbildung

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-3} M

Von links nach rechts:
Kontrolle
Chloramphenicolwirkung
Penicillinwirkung
Streptomycinwirkung

Figur 6

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Wurzelwachstum

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-4} M

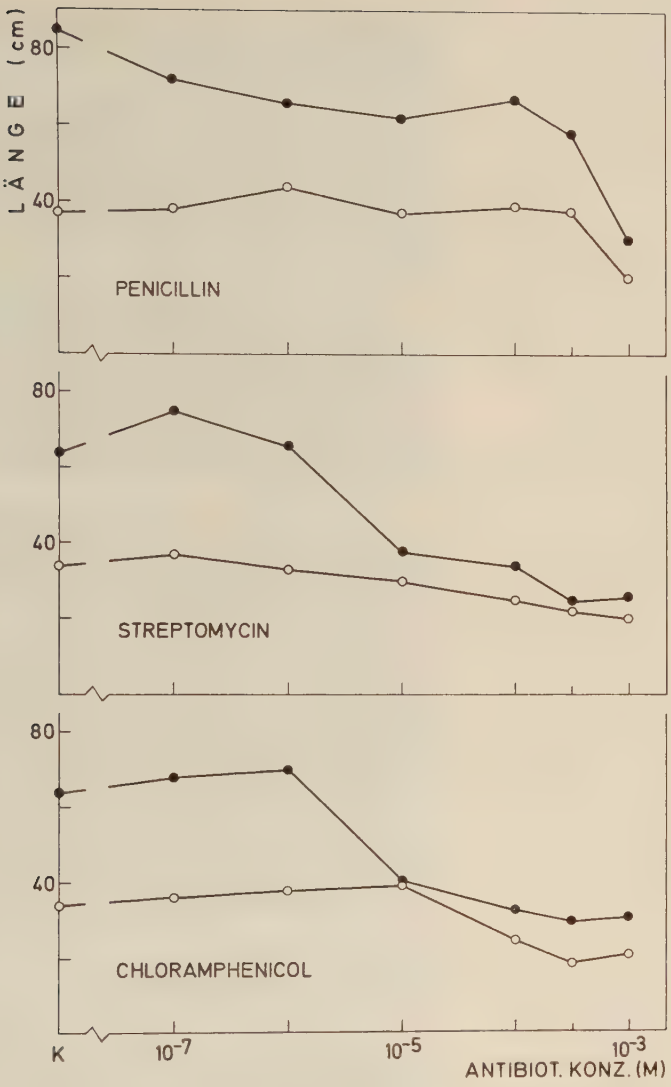
Von links nach rechts:
Kontrolle
Chloramphenicolwirkung
Penicillinwirkung
Streptomycinwirkung

Figur 7

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Wurzelwachstum

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 18 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-3} M

Von links nach rechts:
Kontrolle
Chloramphenicolwirkung
Penicillinwirkung
Streptomycinwirkung



Figur 8

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Längenwachstum

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittelwerte aus 8–10 Pflanzen

○——○ Spross ●——● Wurzel

doch festzuhalten, dass selbst in der Konzentration 10^{-3} M stets eine den Kontrollpflanzen entsprechende Anzahl Blätter ausgebildet wird.

Die erwähnte Stimulierung des Wachstums mag in den vorliegenden Figuren nicht unbedingt signifikant erscheinen. Durch eine eingehende Betrachtung der Verhältnisse unter Berücksichtigung der Ausbildung von Seiten- und Adventivwurzeln konnte aber diese fördernde Wirkung erhärtet werden. In den betreffenden Konzentrationen zeigte sich nämlich eine zunehmend bessere Ausbildung der Seitenwurzeln und eine stärkere Tendenz zum Adventivwurzelansatz, nach der Reihe:

$K < 10^{-7}\,M < 10^{-6}\,M > 10^{-5}\,M >> 10^{-4}\,M \ldots$

Über 10^{-5}molar erfolgte zunehmende Unterdrückung der Adventiv- und Seitenwurzeln.

Was nun die Hemmung des Wachstums anbetrifft, so können drei interessante Feststellungen erwähnt werden:

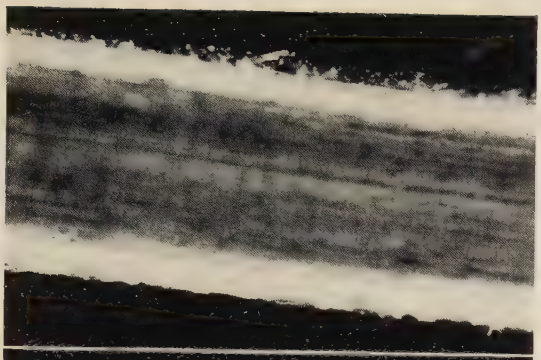
1. Ein Vergleich der Seitenwurzelausbildung in den Konzentrationen 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M und 10^{-3} M lässt erkennen, dass in der höchsten – also «präletalen» - Dosis wieder eine schwache, aber merkliche Förderung statthat (Fig. 6 und 7). Sie lässt sich parallelisieren mit den Beobachtungen über die Pigmenthemmung.

2. In den Konzentrationen 10^{-4} M und höher der 3 Antibiotika konnten nach etwa zehntägiger Kultivierung an den Spitzen der Seitenwurzeln bräunliche, flockige Abscheidungen festgestellt werden. Mikroskopisch gesehen, scheinen hier *mehr* Zellen der Wurzelhaube, eventuell auch der Wurzelspitze abgestossen zu werden als bei den Kontrollen. (Leider war eine photographische Dokumentation nicht möglich, da bei der Präparation sich die Zellhaufen von der Wurzelspitze lösten.)

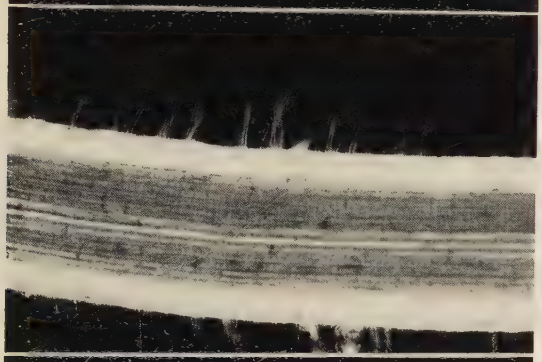
Schopfer et al. (1952) beschreiben insbesondere eine hemmende Wirkung von Streptomycin auf das Wachstum von embryonalen Zellen der Seitenwurzelmeristeme.

Auch Chloramphenicol zeigt eine Wirkung auf zytoplasmatische Strukturen meristematischer Zellen (Sosnova und Hrabetova, 1958), und Penicillin kann Veränderungen des Dermatogens hervorrufen (Bein et al., 1947). Demnach wäre eine Desorganisation des Gewebes in der Spitzenzone der Seitenwurzeln bei pathologisch wirkenden Dosen nicht auszuschliessen. Beschreibt zudem doch Dye (1956) die nekrotische Wirkung höherer Streptomycinkonzentrationen auf Blätter und Stengel.

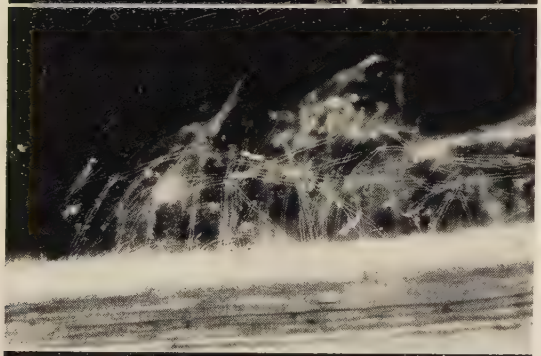
3. Auffallend und von physiologischer Bedeutung ist im weiteren die Bildung von sehr viel mehr und längeren Wurzelhaaren an Haupt- und Seitenwurzeln. Die Abbildungen (Fig. 9 a–d) zeigen je einen Ausschnitt



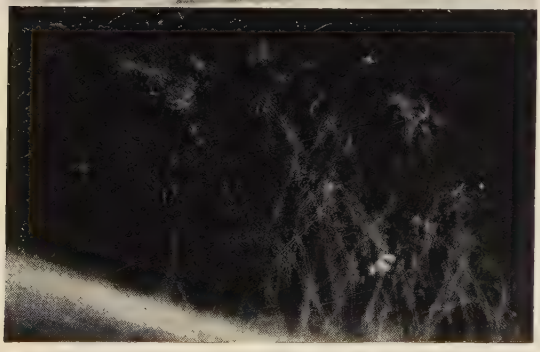
Figur 9 a



Figur 9 b



Figur 9 c



Figur 9 d

Figur 9 a–d

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die Bildung von Wurzelhaaren

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 6 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 3 Tage
Antibiotikumkonzentration in Nährlösung: 10^{-4} M
a = Kontrolle
b = Penicillinwirkung
c = Chloramphenicolwirkung
d = Streptomycinwirkung
Alle Aufnahmen in gleicher Gesamtvergrösserung

einer Hauptwurzel von Kontrolle, Penicillin, Chloramphenicol und Streptomycin (10^{-4} M).

Während bei den Kontrollen nur wenige, kurze Wurzelhaare zu finden sind, treten sie in den Antibiotikakonzentrationen 10^{-4}molar und höher ab ca. 1 cm hinter der Spitze der Hauptwurzel bis in die Region der Seitenwurzeln hinein und selbst an letzteren in dichter Masse auf. Dabei zeichnet sich auch hierin eine verschiedene Intensität in der Effektivität der 3 Antibiotika ab, welche in die Gruppierung der medizinischen Giftigkeit passt: je toxischer das Antibiotikum, desto mehr Wurzelhaare werden gebildet.

Diese Erscheinung ist bereits am zweiten Tage nach der Antibiotikumgabe signifikant.

Beeinflussung des Trockengewichtes

Eine weitere Beurteilung der Antibiotikumwirkung kann mit Hilfe des Trockengewichtes gewonnen werden (Fig. 10). Es erweist sich eine deutliche Parallelität zum Längenwachstum. Während Penicillin nur in der stärksten Dosis eine prägnante Änderung des Trockengewichts im Sinne einer Hemmung bewirkt, zeigen die Kurven für Streptomycin und Chloramphenicol im nichttoxischen Konzentrationsbereich wiederum Förderung und in toxischen bis letalen Dosen einen hemmenden Einfluss.

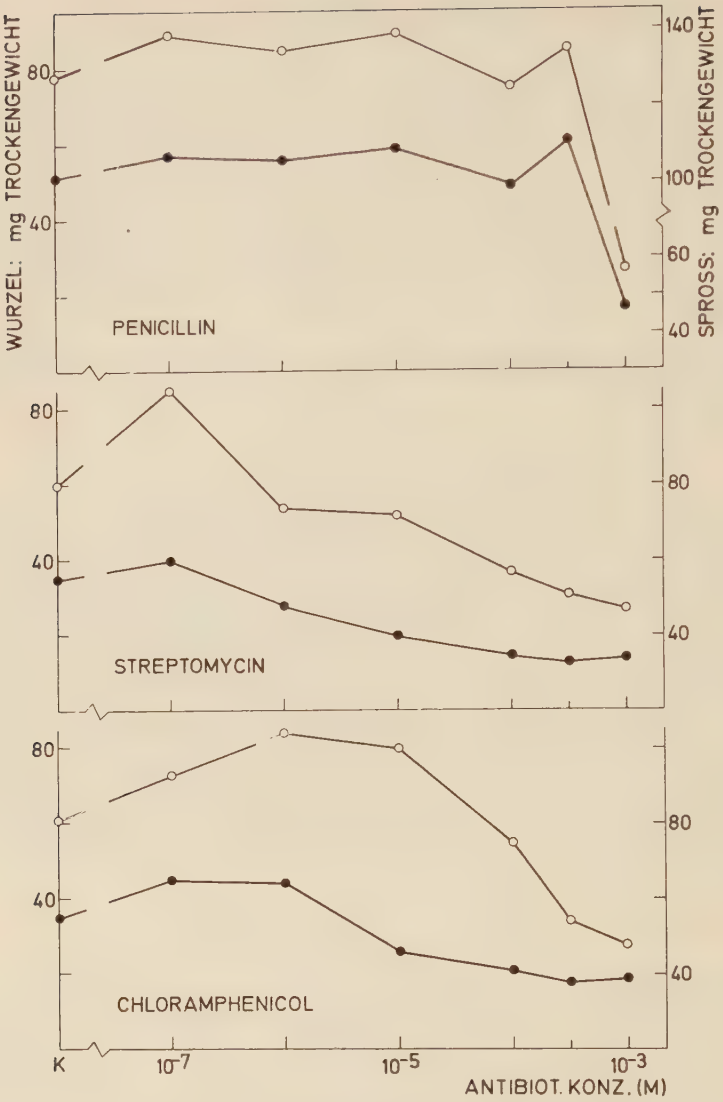
Insgesamt sind nach den Ergebnissen der gemachten Untersuchungen hemmende *und* fördernde Einflüsse auf das Wachstum zu verzeichnen, welche abhängig von der Antibiotikumkonzentration sind und welche nicht auf eine Antibiotikumspezifität hinweisen.

Der Einfluss auf die Wasseraufnahme

Parallelgehend mit den Wachstumsveränderungen kann auch eine veränderte Aufnahme von Wasser festgestellt werden. Diese äussert sich jedoch erst in den hohen Antibiotikumkonzentrationen in signifikanter Weise, das heisst, wo auch die wachstums*hemmenden* Effekte deutlich hervortreten. Bei allen 3 Antibiotika war die stärkste Hemmung der Wasseraufnahme stets in der präletalen Konzentration mit 50% gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen.

Diese Veränderung im Wasserhaushalt kann als weiterer Ausdruck der Beeinflussung des Wachstums durch die Antibiotika angesehen werden.

Eine markante Erhöhung der Transpiration, welche etwa in einer signifikanten Erhöhung der Wasseraufnahme zum Ausdruck gekommen wäre, wurde nicht festgestellt.



Figur 10

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Trockengewicht

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittelwerte aus 8–10 Pflanzen

○——○ Spross ●——● Wurzel

Winter (1952) konnte erkennen, dass Penicillin in höheren Konzentrationen die Guttation hemmt.

Diese Beobachtungen konnten auch in meinen Versuchen bestätigt werden. Etwa 2–3 Tage nach der Antibiotikumzugabe konnten an den Pflanzen der höchsten Konzentrationen keine Guttationstropfen mehr beobachtet werden.

Allgemein gesehen, dürfte die Beeinflussung des Wasserhaushaltes kaum in ihrer Intensität mit jener durch Patulin bewirkten zu vergleichen sein, welches Antibiotikum als Welkstoff und starkes Plasmagift bekannt ist (Gäumann und Jaag, 1947; Gäumann et al., 1947).

Der Einfluss auf die Ionenaufnahme

Im Zusammenhang mit dem Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf das Wachstum der Pflanze ist die Untersuchung der Beeinflussung der Ionenaufnahme von unbedingtem Interesse. Diese Frage ist jedoch bis heute kaum an intakten Pflanzen untersucht worden.

Durch verschiedene Arbeiten, welche die Beziehungen zwischen der Ionenaufnahme und der Proteinsynthese abzuklären versuchten und in welchen Chloramphenicol als spezifischer Inhibitor der Eiweissynthese verwendet wurde, sind dessen hemmende Einflüsse auf die Aufnahme verschiedener Ionen bekanntgeworden. Die Untersuchungen wurden jedoch – mit Ausnahme der Arbeiten von Uhler (1961) sowie Uhler und Russell (1963) – an isolierten Zellen (Jyung et al., 1965), isolierten Organellen (Hanson und Hodges, 1963) bzw. mit Gewebestücken gemacht (Ellis, 1963; Jacoby und Sutcliffe, 1962; Sutcliffe, 1960) oder an einzelnen Organen, wie Blättern (Jyung und Wittwer, 1964) bzw. isolierten Wurzeln (Balogh et al., 1961; Höfner, 1963). Es fehlen zudem die Vergleichsmöglichkeiten mit Penicillin und Streptomycin, die zu erhalten ein weiteres Ziel dieser vorliegenden Arbeit war.

Es wurde zu diesem Zweck die Aufnahme von Kalium und Calcium (als Vertreter der Nährelemente) und von Strontium (ein für die Pflanze reines Ballastelement) bestimmt. Die aktivierungsanalytische Gehaltsermittlung erfolgte jeweils nach Abschluss einer gewissen Wachstumsperiode, während welcher die Pflanzen unter der Wirkung verschiedener Konzentrationen der erwähnten 3 Antibiotika standen.

Anmerkung: Es soll an dieser Stelle darauf aufmerksam gemacht werden, dass in den verschiedenen Figuren der Gehalt in Form von Impulszahlen aufgetragen ist. Diese sind gemäss der Aktivierungsanalyse abhängig von der Intensität der Bestrahlung. Da im Rahmen einer Aktivierung stets Wurzel- bzw. Sprossproben nicht genau denselben Verhält-

nissen im Neutronenfluss ausgesetzt waren, kann anhand der Kurven kein Gehaltsvergleich von Wurzel und Spross gemacht werden. Dafür – insbesondere auch für Vergleiche zwischen verschiedenen Antibiotika – sind allein die Tabellen (Tab. 4, 5 und 6) massgebend, in denen durch Berücksichtigung der Eichproben der Elementgehalt pro Gramm Trokkengewicht ausgerechnet ist.

Die Effekte auf die *Kalium*-Aufnahme

Die Kurven (Fig. 11) zeigen einen für Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol gleichartigen Verlauf. Dieser ist interessanterweise im

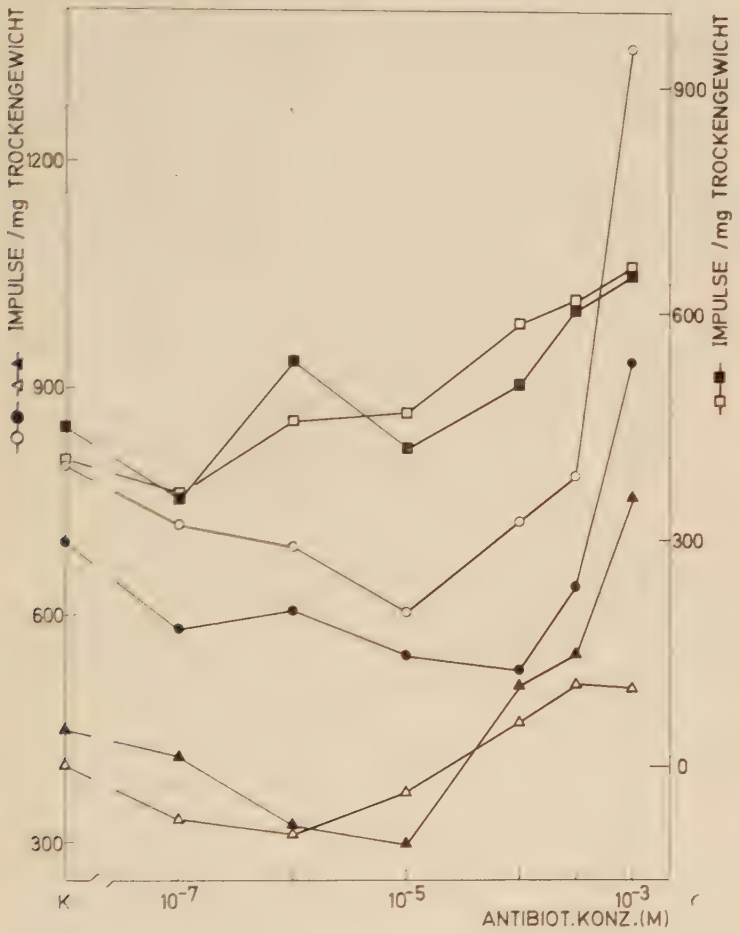
Tabelle 4

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die Aufnahme von *Kalium*

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittels Eichproben aus den Impulszahlen errechnete Gehaltswerte

	Antibiotikum-konzentration (M)	Kaliumgehalt			
		γ K/g TG		in % der Kontrolle	
		Wurzel	Spross	Wurzel	Spross
Penicillin	—	13 900	33 400	100	100
	10^{-7}	11 500	30 200	83	90
	10^{-6}	12 100	29 000	87	87
	10^{-5}	10 900	25 300	78	76
	10^{-4}	10 500	30 400	76	92
	$5 \cdot 10^{-4}$	12 700	32 800	91	98
	10^{-3}	18 600	56 600	134	170
Streptomycin	—	22 500	44 800	100	100
	10^{-7}	17 700	40 100	79	89
	10^{-6}	27 000	50 700	120	113
	10^{-5}	21 100	52 100	94	116
	10^{-4}	25 300	65 000	112	145
	$5 \cdot 10^{-4}$	30 300	68 700	135	153
	10^{-3}	32 800	73 700	146	165
Chlor-amphenicol	—	22 500	44 800	100	100
	10^{-7}	20 600	36 900	92	82
	10^{-6}	16 100	34 500	72	77
	10^{-5}	14 900	40 900	66	91
	10^{-4}	25 500	51 100	113	114
	$5 \cdot 10^{-4}$	27 500	56 600	122	126
	10^{-3}	38 000	55 900	169	125

Vergleich zu demjenigen von Kurven über Wachstum und Trockengewicht spiegelbildlich. Ist hier doch eine Hemmung der Aufnahme im nichttoxischen und eine Förderung, die zum Teil ganz beachtliche Werte

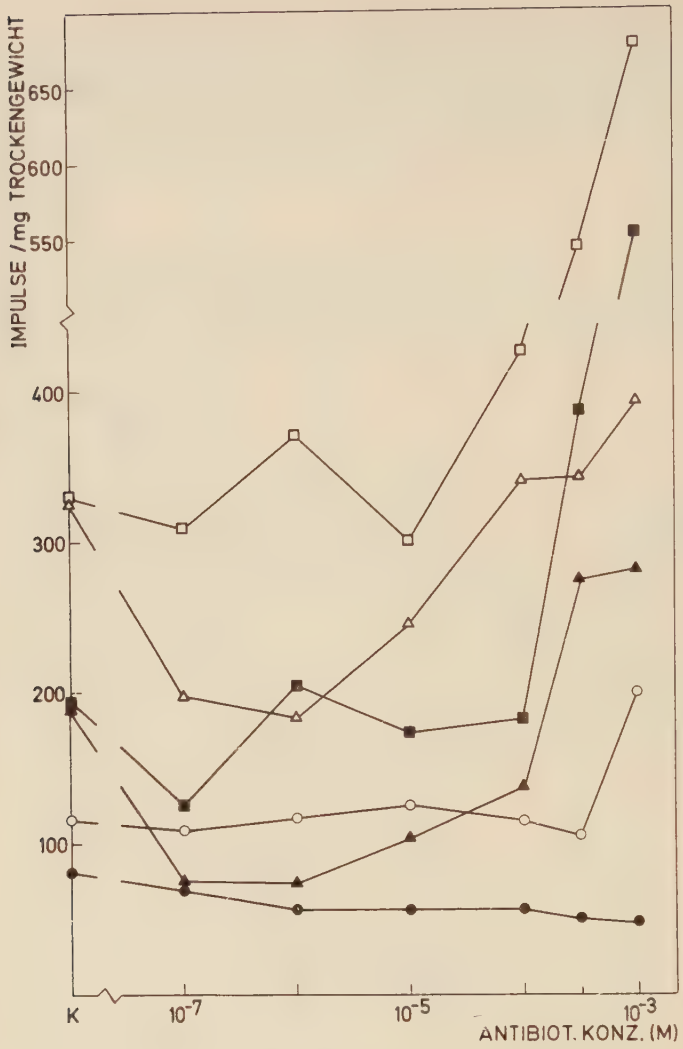


Figur 11

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die *Kalium*-Aufnahme

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittelwerte aus 8 Pflanzen
Berücksichtige Anmerkung S. 237

Penicillin: ●———● Wurzel ○———○ Spross
Streptomycin: ■———■ Wurzel □———□ Spross
Chloramphenicol: ▲———▲ Wurzel △———△ Spross



Figur 12

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die *Calcium*-Aufnahme

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittelwerte aus 8 Pflanzen
Berücksichtige Anmerkung S. 237

Penicillin: ●——● Wurzel ○——○ Spross
Streptomycin: ■——■ Wurzel □——□ Spross
Chloramphenicol: ▲——▲ Wurzel △——△ Spross

annimmt, im toxischen Konzentrationsbereich zu finden. Unterschiede im Vergleich der 3 Antibiotika sind höchstens ausgeprägt in der Breite hemmend wirkender Dosisbereiche bzw. in der Intensität der inhibierenden oder stimulierenden Wirkung.

Auch die Tabelle (Tab. 4), in welcher die Werte für den Kaliumanteil am Trockengewicht bzw. des prozentualen Vergleichs zur Kontrolle zusammengestellt sind, gibt keinen Hinweis auf ein spezifisch anderes Verhalten in der Wirkung eines dieser 3 Antibiotika.

Aus der Tabelle geht weiterhin hervor, dass der Kaliumgehalt der Wurzeln stets geringer ist als jener der Sprosse. Daraus lässt sich schliessen, dass keines der Antibiotika den Transport dieses Ions von der Wurzel

Tabelle 5

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die Aufnahme von *Calcium*

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittels Eichproben aus den Impulszahlen errechnete Gehaltswerte

	Antibiotikum-konzentration (M)	Calciumgehalt			
		γ Ca/g TG		in % der Kontrolle	
		Wurzel	Spross	Wurzel	Spross
Penicillin	—	280	551	100	100
	10^{-7}	235	513	84	93
	10^{-6}	191	551	68	100
	10^{-5}	194	594	69	108
	10^{-4}	191	542	68	98
	$5 \cdot 10^{-4}$	170	494	61	90
	10^{-3}	164	945	59	172
Streptomycin	—	130	846	100	100
	10^{-7}	85	792	65	94
	10^{-6}	137	959	105	113
	10^{-5}	116	771	89	91
	10^{-4}	122	1090	94	129
	$5 \cdot 10^{-4}$	260	1400	200	166
	10^{-3}	372	1740	286	206
Chlor-amphenicol	—	131	846	100	100
	10^{-7}	51	506	39	60
	10^{-6}	49	470	37	56
	10^{-5}	69	630	53	75
	10^{-4}	92	874	70	103
	$5 \cdot 10^{-4}$	184	877	140	104
	10^{-3}	188	1010	144	119

in den Spross blockieren durfte, was in der Folge durch eine signifikante Ankaufung von Kalium in der Wurzel im Vergleich zum Gehalt im Spross sichtbar werden müsste.

Die Effekte auf die *Calcium*-Aufnahme

Es ist allgemein bekannt, dass Kalium und Calcium nicht nur ernährungsphysiologisch für die Pflanze von grosser Wichtigkeit sind, sondern dass die beiden Elemente durch ihre antagonistische Wirkungsweise im pflanzlichen Organismus eine bedeutende Rolle spielen (Bollard und Butler, 1966; Evans und Sorger, 1966).

In dieser Hinsicht schien die Untersuchung des Effektes der Antibiotika auf die Aufnahme von Calcium als interessant und sinnvoll.

Die Versuche ergaben, wie die Kurven (Fig. 12) zeigen, einen der Kaliumaufnahme insgesamt durchaus vergleichbaren Effekt. Die Tabelle 5 zeigt zudem, dass der Calciumgehalt im Vergleich zu jenem von Kalium viel geringer ist (was allgemein bekannt ist) und eine vorwiegende Lokalisation des Calciums im Spross. Unterschiede zwischen Kalium- und Calciumaufnahme bestehen nur hinsichtlich der Verschiebung des hemmenden bzw. fördernden Konzentrationsbereiches der Antibiotika. So zeigt zum Beispiel ein Vergleich der Kurven der Penicillinwirkung (Fig. 11 bzw. 12) in toxischen Konzentrationen eine Erhöhung des Kaliumgehaltes in der Wurzel, während die Calciumaufnahme durchwegs gehemmt wird; oder im Vergleich zur Hemmung der Kaliumaufnahme durch Penicillin im Spross bleibt jene von Calcium in weitem Bereich unbeeinflusst.

Eine Beurteilung dieser Unterschiede durch selektive Wirkung dieses Antibiotikums auf die Aufnahme dieser beiden Nährelemente ist sehr schwierig, da solche Verschiedenheiten – wie in der Diskussion noch zum Ausdruck kommen wird – auch durch Beeinflussung der verschiedensten Vorgänge sekundär entstehen könnten.

Dagegen ist durchaus möglich, dass die Wirkung eines bestimmten Antibiotikums hinsichtlich der Aufnahme verschiedenwertiger Ionen verschieden stark ist. Die Verhältnisse für Streptomycin weisen auf eine solche Abhängigkeit hin (vgl. Tab. 4 und 5).

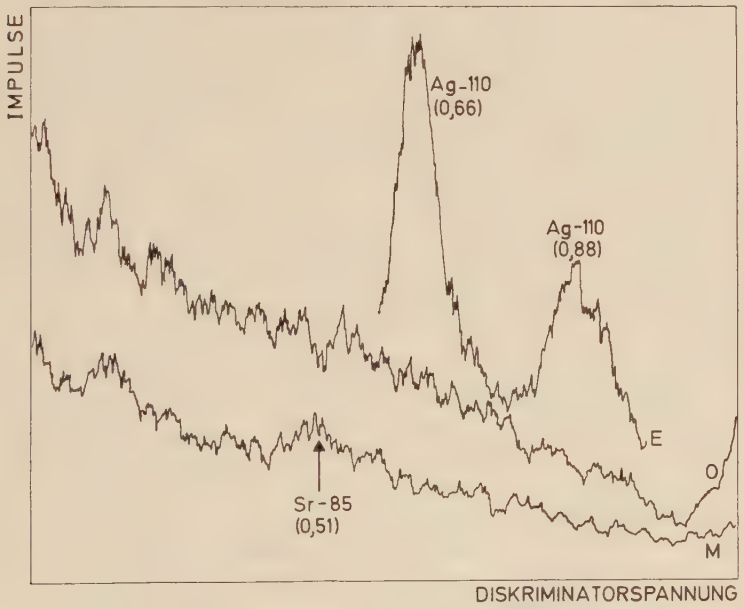
In welchem Masse dies für alle 3 verwendeten Antibiotika zutreffen könnte, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht voll entschieden werden.

Die Effekte auf die *Strontium*-Aufnahme

Über die Aufnahme des Ballastelements Strontium ist allgemein bekannt, dass sie in Konkurrenz mit jener von Calcium geschieht (Collan-

der, 1941). Es war daher interessant, zu erfahren, ob sich Antibiotikaeinflüsse auf die Strontiumaufnahme an jene der Calciumaufnahme angleichen lassen.

Die Bestimmung des Strontiums gestaltete sich, verglichen mit den Bestimmungen von Kalium und Calcium, schwieriger. Wie das Spektrum (Fig. 1) zeigt, liegt das Strontium-85-Maximum im Bereiche der niederenergetischen Strahler, wodurch seine Gammastrahlung von einem hohen Untergrunde begleitet ist. Zudem fällt an dieselbe Stelle ein Maximum von Calcium-47. Dies hat zur Folge, dass die Bestimmung des Strontiums erst geschehen kann, wenn die Strahlung von Calcium-47 abgeklungen und die Gesamtstrahlung des Untergrundes möglichst reduziert ist. Diese Wartezeit wird durch die relativ lange Halbwertszeit von Strontium-85 (T = 65 Tage) – demgegenüber Calcium-47: T = 4,7 Tage – ermöglicht, allerdings unter entsprechender Einbusse an Impulsen pro Zeiteinheit.

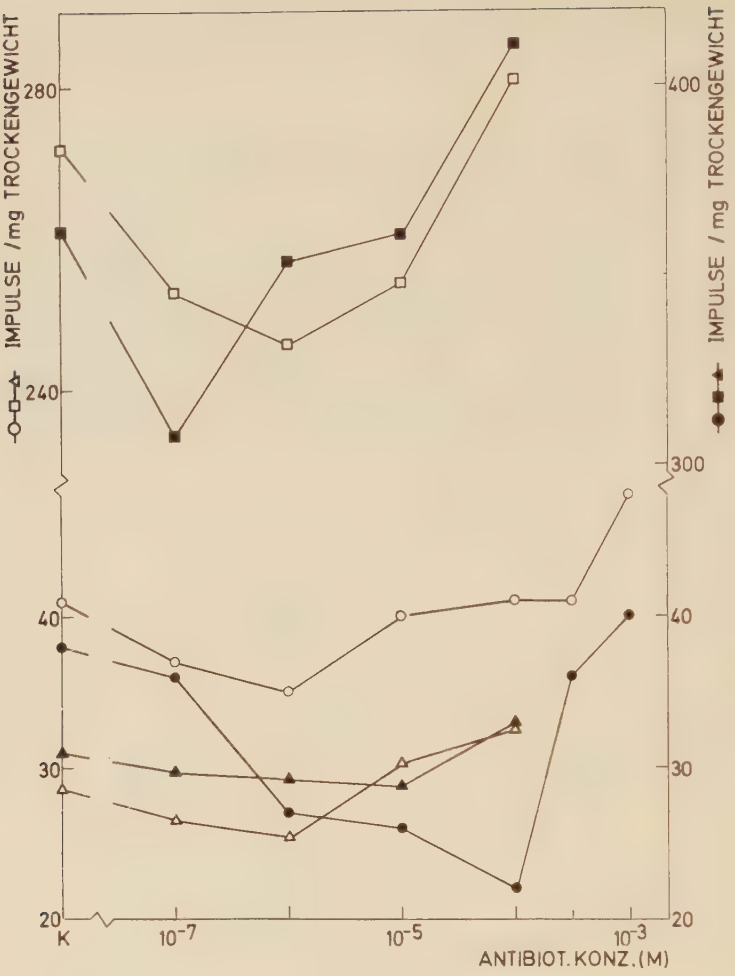


Figur 13

Gammaspektren von Wurzelproben von *Zea Mays*

Laufzeit des Spektrums:	14 min
Logarithmische Abschwächung:	1,254
Kanalbreite:	1 V

E = Eichung mit Ag-110
O = Spektrum der Probe *ohne* Strontium
M = Spektrum der Probe *mit* Strontium



Figur 14

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die *Strontium*-Aufnahme

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittelwerte aus 10 Pflanzen
Berücksichtige Anmerkung S. 237

Penicillin: ●——● Wurzel ○——○ Spross
Streptomycin: ■——■ Wurzel □——□ Spross
Chloramphenicol: ▲——▲ Wurzel △——△ Spross

Trotz einer Wartezeit von 60 Tagen verändert sich das Verhältnis der reinen Strontium-85-Strahlung zu jener des Untergrundes jedoch nicht wesentlich, obwohl nun die Störung durch Calcium-47 nicht mehr in Betracht fällt. Ein Spektrenvergleich von Proben *mit* bzw. *ohne* Strontium (Fig. 13) nach einer 60tägigen Wartezeit zeigt im ersten Falle an der Stelle von Strontium-85 ein Maximum bzw. im zweiten Falle ein Minimum, jedoch insgesamt nur einen geringen Anteil reine Strontiumstrahlung.

Dies bedeutet, dass wohl die Strontiumstelle im Spektrum definiert werden kann, sich die quantitative Analyse jedoch nur mit relativ langen

Tabelle 6

Zea Mays: Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol auf die Aufnahme von *Strontium*

Alter der Keimpflanzen bei Antibiotikumzusatz: 7 Tage
Wachstum mit Antibiotikum: 14 Tage
Mittels Eichproben aus den Impulszahlen errechnete Gehaltswerte

	Antibiotikum-konzentration (M)	Strontiumgehalt			
		γ Sr/g TG		in % der Kontrolle	
		Wurzel	Spross	Wurzel	Spross
Penicillin	—	272	261	100	100
	10^{-7}	253	231	93	88
	10^{-6}	189	218	70	84
	10^{-5}	184	251	68	96
	10^{-4}	157	259	58	99
	$5 \cdot 10^{-4}$	255	259	94	99
	10^{-3}	282	303	104	116
Streptomycin	—	528	397	100	100
	10^{-7}	450	369	85	93
	10^{-6}	516	358	98	90
	10^{-5}	527	370	100	93
	10^{-4}	599	409	113	103
	$5 \cdot 10^{-4}$	*	*	*	*
	10^{-3}	*	*	*	*
Chlor-amphenicol	—	390	350	100	100
	10^{-7}	380	330	97	94
	10^{-6}	370	300	95	86
	10^{-5}	370	370	95	106
	10^{-4}	420	400	108	114
	$5 \cdot 10^{-4}$	*	*	*	*
	10^{-3}	*	*	*	*

* = nicht getestete Konzentrationen

Messzeiten durchführen lässt. Ausserdem nimmt die Genauigkeit durch die sich schwierig gestaltende Subtraktion des Untergrundes ab.

Die Messergebnisse der Strontiumanalysen ergaben, wie die Kurven (Fig. 14) zeigen, eine der Kalium- und Calciumaufnahme gleichartige Beeinflussung durch die Antibiotika.

Bei den Untersuchungen der Aufnahme dieses Ions wurde aus versuchstechnischen Gründen nur in der Anwendung von Penicillin die volle Konzentrationsreihe getestet. Für Streptomycin und Chloramphenicol fehlen die Werte für die präletalen Dosen. Jedoch dürfte mit grosser Wahrscheinlichkeit ein anderes Verhalten als bei Penicillin, das in diesen Dosen eine weitere Verstärkung der Aufnahme zeigt, auszuschliessen sein.

Anhand der Tabellen (Tab. 6) zeigt sich wiederum eine grössere Effektivität von Streptomycin und Chloramphenicol, verglichen mit Penicillin.

Zudem liegt der Gehalt an Strontium in einer Grössenordnung, die mit dem Calciumgehalt vergleichbar ist. Dieser Befund kann als Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeiten taxiert werden, die dahin gehen, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Calcium und Strontium im Nährmedium diese beiden Ionen annähernd im selben Verhältnis aufgenommen werden, wie sie konzentrationsmässig im Substrat vorhanden sind (Collander, 1937, 1941). Dies lässt sich mit den Verhältnissen der Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit vereinbaren; waren doch beide Ionen in ungefähr derselben Konzentration in der Nährlösung gegenwärtig.

Abschliessend kann gesagt werden, dass eine gesamthafte Betrachtung – unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit – keine signifikante *ionenspezifische* Wirkung der Antibiotika auf die Aufnahme von Kalium, Calcium sowie Strontium erkennen lässt.

Die Veränderungen der Ionenaufnahme dürften Sekundäreffekte sein, welche durch verschiedene primäre Wirkungen der Antibiotika auf wichtige Stoffwechselvorgänge entstehen.

Diskussion

Die Resultate dieser Arbeit geben einen Überblick über die Effekte, die durch Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol hinsichtlich Wachstums und Kationenaufnahme bei intakten höheren Pflanzen entstehen können.

Es ist klar, dass die Ergebnisse sich nur in beschränktem Masse mit den Verhältnissen und Vorgängen in der freien Natur vergleichen lassen.

Während im Experiment unter stark vereinfachten Bedingungen gearbeitet werden muss, werden im komplexen natürlichen System des Bodens die verschiedensten Faktoren eine Überlagerung von Effekten ergeben, die eine Interpretation verunmöglichen.

Eine weitgehende Vereinfachung dieses Systems zu Versuchszwecken lässt nun zwar das eindeutige Erkennen der Effekte zu, jedoch eine Erklärung, bei der auch die Mannigfaltigkeit von Reaktionen, die in einem lebenden Organismus ablaufen, berücksichtigt werden müssen, wirft nicht minder schwierige Probleme auf. Sind doch Erscheinungen wie das Ausbleichen der Blätter oder die Hemmung bzw. Stimulierung des Wachstums gleichsam der makroskopische Ausdruck von chemischen oder physikalisch-chemischen Vorgängen, die sich im molekularen Bereich abspielen.

Es war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, näher zu untersuchen, ob die Veränderungen des Wachstums und der Ionenaufnahme durch eine direkte spezifische Wirkung der Antibiotika auf gewisse stoffwechselwichtige Zentren im Spross bzw. der Wurzel zustande kommen oder ob eine Blockierung von Atmung oder Proteinsynthese als Ursache in Frage kommt.

Die in den Resultaten erkennbare Vergleichbarkeit der Effekte sowohl von Penicillin wie auch von Streptomycin und Chloramphenicol lässt vermuten, dass weniger eine spezifische Wirkung, sondern eher eine Beeinflussung von stoffwechselphysiologisch wichtigen Vorgängen eine Rolle spielt. Zeigen doch die verschiedensten Untersuchungen, dass sowohl im Falle des Streptomycins als auch des Chloramphenicols nicht an eine *einzige* spezifische Wirkung gedacht werden kann. So weisen, abgesehen von der allgemein bekannten Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol, Arbeiten von Sosnova und Hrabetova (1958) und Stoner et al. (1964) auf die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung und der ATPase-Aktivität durch dieses Antibiotikum hin. Zudem gehören auch die Fällung von Nucleinsäuren und Nucleoproteiden sowie die Hemmung des Einbaues von Aminosäuren in die Proteine der Mitochondrien und der Bindung von Messenger-RNS an Ribosomen zu seinen Wirkungseigenschaften (Das et al., 1964; Penny und Galston, 1966; Weisberger und Wolfe, 1964). Die meisten dieser Wirkungen sind aber nicht spezifisch für Chloramphenicol, sondern können auch für Streptomycin angenommen werden (Das et al., 1964; Euler, 1953; Kandeler, 1959; Pestka et al., 1965).

Es ist daher verständlich, dass bei einer derartigen Vielfalt von Wirkungsmöglichkeiten die Abklärung des genauen Reaktionsweges, der schliesslich zur Pigmentblockierung bzw. zu einer Hemmung oder Stimulierung des Wachstums führt, bis heute noch nicht gelungen ist.

Rossner (1960) zeigte anhand licht- und elektronenoptischer Untersuchungen, dass unter Streptomycineinfluss die normale Ontogenese der Chloroplasten gestört wird. Dieser Hemmung der Plastidenbildung geht eine mehr oder minder starke Verhinderung der Chlorophyllsynthese parallel, wobei die Umwandlung von Protochlorophyll in Chlorophyll a oder die Bildung eines Pigmentvorläufers blockiert wird (Ledoyen, 1957) bzw. eine von Rosen und Gawlik (1961) postulierte Bindung von Magnesium durch Streptomycin die Blockierung des Mg-benötigenden Schrittes in der Synthese des Chlorophylls bewirkt. Dass das im Moment der Antibiotikumwirkung bereits ausgebildete Chlorophyll nicht abgebaut wird, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Diese schwerwiegende Hemmung der Photosynthese dürfte wohl in direkter Weise das Wachstum und die Stoffwechselvorgänge überhaupt beeinflussen.

Aus den Resultaten dieser Arbeit geht hervor, dass die Reduktionen des Wachstums vor allem dann bedeutend werden, wenn die Blockierung der Pigmente und damit der CO_2-Assimilation statthat. Zudem zeigt sich umgekehrt eine leichte Förderung der Wachstumsrate in der höchsten Antibiotikumkonzentration (10^{-3} M), für die eine entsprechende Verminderung der Chlorophyllhemmung erkennbar ist. Diese dürfte im Zusammenhang mit der stark geförderten Ionenaufnahme stehen; zeigten doch Gray (1955), Rosen (1957), Rosen und Gawlik (1961) sowie Zahn (1962a, b, c) in ihren Untersuchungen, dass durch die verschiedensten Kationen eine gewisse Entgiftung der Antibiotikumwirkung erzielt wird. Es dürfte jedoch kaum möglich sein, die Wachstumsänderungen allein durch die mehr oder minder starke Blockierung des Assimilationsvorganges zu interpretieren.

Aus den Arbeiten von Calo et al. (1957) und Srivastava und Meredith (1962) geht hervor, dass zumindest in gewissem Grade Atmung sowie Proteinsynthese und -stoffwechsel zu berücksichtigen sind. Eine Wachstumsförderung insbesondere, wie sie auch in dieser Arbeit erscheint, dürfte nur zu erklären sein unter Miteinbezug der von Nickell und Finlay (1954) angeführten Hypothesen über die Wirkung von Antibiotika auf Vitamin- und Hormonstoffwechsel bzw. der Entgiftung von toxischen Stoffwechselprodukten durch dieselben.

Inwieweit insbesondere Atmung und Proteinsynthese in direkter Beziehung zur Ionenaufnahme stehen, ist bis heute nicht abgeklärt. Die Untersuchungen von Steward und Preston (1941) weisen auf einen engen Zusammenhang hin. Ebenso die Untersuchungen von Steward (1954), Steward und Millar (1954) sowie Russell (1954) und die neueren Arbeiten, welche Chloramphenicol als Inhibitor der Proteinsynthese einbeziehen (Jacoby und Sutcliffe, 1962; Jyung et al., 1965; Sutcliffe,

1960). Im Gegensatz dazu stellen MacDonald et al. (1966) eine solche Beziehung, besonders bei der Chloramphenicolhemmung der Ionenaufnahme, in Frage.

Ein diesbezüglicher Beitrag zur Klärung der gefundenen *Hemmungen* kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gegeben werden.

Was jedoch die *stimulierende* Wirkung auf die Ionenaufnahme anbetrifft, so wird durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen ein Aspekt angezeigt unter Berücksichtigung der Gesamtheit der durch die Antibiotikumwirkung entstehenden Effekte in der Pflanze sowie der einfachen Prinzipien passiver und aktiver Ionenaufnahme und der Bedeutung der Wurzelhaare als Organe der Stoffaufnahme (s. dazu : Läuchli, 1967, und weitere Literatur daselbst).

Die in hohen Konzentrationen der Antibiotika stark geförderte Ausbildung von Wurzelhaaren – welche in ihrem Wesen nicht gedeutet werden kann – bringt eine enorme Oberflächenvergrösserung mit sich. Dadurch erhöht sich in entsprechender Weise die Kapazität der Wurzel, Ionen aus der Nährlösung zu adsorbieren, die somit der aktiven Aufnahme zugänglich werden.

Bei weiterer Erhöhung der Antibiotikumdosis in den Bereich der stark toxischen Konzentration, die im Sinne von Sosnova und Hrabetova (1958) bzw. Bein et al. (1947) zu einer Veränderung zytoplasmatischer Strukturen bzw. zum Platzen des Dermatogens führt sowie eine Veränderung der Permeabilität der Plasmagrenzschichten bewirkt (Bandi, 1957; Nickell und Finlay, 1954), könnte sogar die reine Diffusion eine hervortretende Bedeutung im Aufnahmeprozess erhalten.

Wie alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so führt auch diese Betrachtung wieder unvermeidlich zum Schluss, dass alle 3 Antibiotika, trotz Zugehörigkeit zu verschiedenen chemischen Stoffgruppen, gleichartige Vorgänge im Stoffwechsel der Pflanze beeinflussen dürften.

Zusammenfassung

1. Es wurden die Wirkungen von Antibiotika auf Wachstum und Ionenaufnahme (K, Ca, Sr) von intakten, höheren Pflanzen (*Zea Mays* L.) untersucht.
2. Folgende Antibiotika wurden verwendet: Penicillin V, Streptomycin A und Chloramphenicol sowie in einigen Voruntersuchungen auch Penicillin G.
3. Die Pflanzen wurden in definierter, mineralischer Nährlösung aufgezogen, zu der nach einigen Tagen Vorkultur das Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde.

4. Die Antibiotika wurden bis zum Versuchsende in der Nährlösung belassen; ein Verlust ihrer Aktivität war (ausser bei Penicillin G) während der Versuchsperiode nicht festzustellen.

5. Der Gehalt an Kalium, Calcium und Strontium wurde aktivierungsanalytisch bestimmt.

6. Die Untersuchungen umfassten den *nicht*toxischen (10^{-7} 10^{-5} M) sowie den *toxischen* (10^{-5}–10^{-3} M) Konzentrationsbereich der Antibiotika, wobei 10^{-3} M als präletale Dosis bezeichnet werden muss.

7. Die in der Nährlösung vorgelegten Antibiotika konnten in aktiver Form in Wurzel und Spross nachgewiesen werden.

8. Alle 3 Antibiotika bewirken im toxischen Bereich zunehmende Hemmung der Chlorophyllsynthese. In der präletalen Dosis ist eine Abschwächung dieses Effektes zu erkennen.

9. Das Wachstum wird ebenfalls in Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration verändert. Feststellen lassen sich: Förderung im nichttoxischen und Hemmung im toxischen Bereich sowie eine leichte Abschwächung der Hemmung in der präletalen Dosis.

10. Toxische Konzentrationen fördern in starker Weise die Ausbildung von Wurzelhaaren.

11. Die Kationenaufnahme (Kalium, Calcium und Strontium) wird in nichttoxischen Konzentrationen *gehemmt*, in toxischen stark *stimuliert*.

12. Ein Unterschied der 3 Antibiotika in der Beeinflussung von Wachstum und Ionenaufnahme erscheint nur in der Wirkungsintensität.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt.

Ich danke ihm bestens für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Überlassung der Mittel des Institutes. Mein herzlicher Dank gilt zudem Herrn Dr. H. Seiler, PD (Anorganisch-Chemisches Institut, Universität Basel), für seine Hilfe bei den Aktivierungsanalysen und dafür, dass er mir die Messapparaturen zur Verfügung stellte.

Ausserdem verdanke ich bestens:

Herrn Dr. M. Störi (J. R. Geigy AG) die Analyse des Eichmaterials sowie Herrn Prof. J. F. Sutcliffe (Universität Sussex, England) bzw. den Firmen Pfizer AG (Zürich) und Vifor SA (Genf) die kostenlose Überlassung der verschiedenen Antibiotika.

Auch sei Herrn Dr. A. Läuchli für seine Ratschläge, Frl. E. Rudin für ihre Mithilfe, vor allem bei Aufzucht und Abbruch der Pflanzen, und meinem Freund J. Hess für seine Mühe bei der Verfertigung der photographischen Dokumentationen bestens gedankt.

Aaronson S. und S.Scher. 1960. Effect of aminotriazole and streptomycin on multiplication and pigment production of photosynthetic microorganisms. J. Protozool. **7**, 156–158.

Abraham E.P. und E.S.Duthie. 1946. Effect of pH of the medium on activity of streptomycin and penicillin. The Lancet **250**, 455–459.

Alcorn S.M. und P.A.Ark. 1956. Movement of certain antibiotics in cuttings of *Pyracantha* and carnation. Appl. Microbiol. **4**, 126–130.

Balogh E., Z.Böszörményi und E.Cseh. 1961. The effect of chloramphenicol on the amino acid metabolism and ion uptake of isolated wheat roots. Biochim. Biophys. Acta **52**, 381–383.

Bandi P. 1957. Experimentelle Untersuchungen über die kombinierte Wirkung eines pflanzlichen Hormons (β-IES) und eines Antibiotikums (Streptomycin) auf *Pisum*-Wurzeln und auf einige Gewebe. Mitt. Natf. Ges. Bern **NF 15**, 93–156.

Barton L.V. und J.MacNab. 1954. Effect of antibiotics on plant growth. Contr. Boyce Thompson Inst. **17**, 419–434.

Bein M., R.Signer und W.H.Schopfer. 1947. Einfluss von Penicillin auf die Wurzelkultur *(Zea Mays)*. Nachweis von β-Indolylessigsäure (Heteroauxin) im Handelspenicillin. Experientia **3**, 291–292.

Bergmann W. 1958. Methode zur Ermittlung mineralischer Bedürfnisse der Pflanzen. Handb. d. Pflanzenphysiologie **4**, 37–89. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Bilge E. 1962. Morphogenetic effects of streptomycin on the wheat plant. Istanbul Univ. Fak. Mecmusasi, Ser. B Sci. Natur **27**, 251–263.

Black M. und M.Richardson. 1965. Promotion of germination in light-requiring seed by chloramphenicol. Nature **208**, 1114–1115.

Blanchard F.A. und V.M.Diller. 1951. Uptake of aureomycin through the roots of *Phaseolus lunatus*. Amer. J. Bot. **38**, 111–112.

Bollard E.G. und G.W.Butler. 1966. Mineral nutritions of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **17**, 77–112.

Brian P.W. 1957. Effects of antibiotics on plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 8, 413–426.

— J.M.Wright, J.Stubbs und A.M.Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plants. Nature **167**, 347–349.

Brock Th.D. 1961. Chloramphenicol. Bact. Reviews **25**, 32–48.

Bürgin-Wolff A. 1959. Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **69**, 75–111 (Diss. Basel).

Burlet E. 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50**, 519–544 (Diss. Basel).

Calo N., J.Marks und J.E.Varner. 1957. Respiratory metabolism of aerated potato disks. Nature **180**, 1142.

Carlson H.J., H.D.Bissell und M.G.Mueller. 1946. Antimalarial and antibacterial substances separated from higher plants. J. Bacteriology **52**, 155–168.

— H.G.Douglas und J.Robertson. 1948. Antibacterial substances separated from plants. J. Bacteriology **55**, 241–248.

Collander R. 1937. Über die Kationenelektion der höheren Pflanzen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **55**, 74–81.

— 1941. Selective absorption of cations by higher plants. Plant Physiol. **16**, 691–720.

Crowdy S.H. 1957. The uptake and translocation of griseofulvin, streptomycin and chloramphenicol in plants. Ann. Appl. Biol. **45**, 208–215.

— und D.Pramer. 1955. The occurrence of translocated antibiotics in expressed plant sap. Ann. Botany **19**, 81–86.

Das H.K., S.K.Chatterjee und S.C.Roy. 1964. Protein synthesis in plant mitochondria. II. Glutamate and glutamine incorporation and a study of initial steps and streptomycin effect. Biochim. Biophys. Acta, **87**, 478–489.

DeDeken-Grenson M. und A.Godts. 1960. Descendance of *Euglena* cells isolated after various bleaching treatments. Exp. Cell. Research **19**, 376–382.

Donovick R., A.P.Bayan, P.Canales und F.Pansy. 1948. The influence of certain substances on the activity of streptomycin. III. Differential effects of various electrolytes on the action of streptomycin. J. Bacteriology **56**, 125–137.

Drawert H. und M.Mix. 1961. Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an Desmidiaceen. VI. Der Einfluss von Antibiotika auf die Chloroplastenstruktur bei *Micrasterias rotata*. Planta **57**, 51–70.

Duquénois P. 1955. Antibiotiques des plantes supérieures. Bull. Soc. Bot. France **102**, 377–405.

— und D.Schaelderlé. 1958. Revue complémentaire sur les antibiotiques des plantes supérieures. Bull. Soc. Bot. France **105**, 526–560.

Dye M.H. 1956. Studies on the uptake and translocation of streptomycin by peach seedlings. Ann. Appl. Biol. **44**, 567–575.

Ebringer L. 1963. Inhibiting of chlorophyll synthesis by some antibiotics in *Euglena gracilis*. Acta Fac. Rerum Natur. Univ. Comeniae Bot. **8**, 303–320.

Ellis R.J. 1963. Chloramphenicol and uptake of salt in plant. Nature **200**, 596–597.

Euler von H. 1950. Einfluss von Streptomycin auf Samen normaler und chlorophylldefekter Gerste. Z.f.Naturforschung **5b**, 448.

— 1953. Einfluss von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf keimende Samen grüner Pflanzen. Z. Physiol. Chem. **295**, 411–413.

— und M.L.Stein. 1955. Einfluss von Streptomycin und von Tetracyclinen auf die Entwicklung keimender Samen. Experientia **11**, 108–110.

Evans H.J. und G.J.Sorger. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. Ann. Rev. Plant Physiol. **17**, 47–76.

Fisher R.A. und F.Yates. 1948. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver and Boyd, London, Edinburgh.

Frei P. 1963. Die Aufnahme von Strontium durch *Zea Mays* L. in Mischkultur mit Bodenpilzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **73**, 21–57 (Diss. Basel).

Gäumann E. und O.Jaag. 1947. Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**, 132–147.

— O.Jaag und R.Braun. 1947. Antibiotika als pflanzliche Plasmagifte. Experentia **3**, 70–71.

Goodman R.N. und W.M.Dowler. 1958. The absorption of streptomycin by bean plants as influenced by growth regulators and humectants. Plant Disease Reporter **42**, 122–126.

— und H.S.Goldberg. 1960. The influence of cation competition, time and temperature on the uptake of streptomycin by foliage. Phytopathology **50**, 851–854.

Gray R.A. 1955. Inhibition of root growth by streptomycin and reversal of the inhibition by manganese. Amer. J. Bot. **42**, 327–331.

Hanson J.B. und T.K.Hodges. 1963. Uncoupling action of chloramphenicol as basis for the inhibition of ion accumulation. Nature **200**, 1009.

Hodges T.K. 1966. Oligomycin inhibition of ion transport in plant *(Avena sativa)* roots. Nature **209**, 425–426.

Höfner W. 1963. Chloramphenicol-Einfluss auf ^{14}C-Aufnahme isolierter Gerstenwurzeln aus $NaH^{14}CO_3$. Naturwissenschaften **50**, 720.

Horne R.E. und A.L.Pollard. 1948. The identification of streptomycin on paper strip chromatograms. J. Bacteriology **55**, 231–234.

Hurwitz Ch. 1965. Mechanism of action of streptomycin. Zusammenfassung in: Biol. Abstracts **46**, Abstract Nr. 40015.

Jacoby B. und J.F.Sutcliffe. 1962. Connexion between protein synthesis and salt absorption in plant cells. Nature **195**, 1014.

Jirovec O. 1949. Der Einfluss des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. Experientia **5**, 74–77.

Jyung W.H. und S.H.Wittwer. 1964. Foliar absorption—an active uptake process. Amer. J. Bot. **51**, 437–444.

— S.H.Wittwer und M.J.Bukovac. 1965. Ion uptake and protein synthesis in enzymatically isolated plant cells. Natue **205**, 921–922.

Kandeler R. 1959. Über die Wirkung von Dunkelrot- und Weisslicht auf die Antocyanbildung nach Ausschaltung der Chlorophyllbildung durch Antibiotika. Naturwissenschaften **46**, 452–453.

Kirk J.T.O. und R.L.Allen. 1965. Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: Effect of actidione. Biochem. Biophys. Res. Commun. **21**, 523–530.

Kovacs G. 1964. Studies on antibiotic substances from higher plants, with special reference to their plant pathological importance. Kongelige Veterinaer Landbohojskole Arsskrift **14**, 47–92.

Läuchli A. 1962. Über die Aufnahme von Strontium durch höhere Pflanzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **72**, 147–197 (Diss. Basel).

— 1966. Aufnahme von Strontium durch höhere Pflanzen in Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **76**, 239–246.

— 1967. Untersuchungen über Verteilung und Transport von Ionen in Pflanzengeweben mit der Röntgen-Mikrosonde. Im Druck.

Ledoyen M. 1957. L'action de la streptomycine sur la formation de la chlorophylle et de la protochlorophylle. Bull. Soc. Roy. Sci. Liège **26**, 226–233.

Linskens H.F. 1959. Papierchromatographie in der Botanik. 2.Auflage. Springer, Berlin.

Litwack G. und D.Pramer. 1957. Absorption of antibiotics by plant cells. III. Kinetics of streptomycin uptake. Arch. Biochem. Biophys. **68**, 396–402.

MacDonald I.R., J.S.D.Bacon, D.Vaughan und R.J.Ellis. 1966. The relation between ion absorption and protein synthesis in beet disks. J. Exp. Bot. **17**, 822–837.

Mitchell W., W.J.Zaumeyer und W.P.Anderson. 1952. Translocation of streptomycin in bean plants and its effect on bacterial blights. Science **115**, 114–115.

— W.J.Zaumeyer und W.H.Preston. 1954. Absorption and translocation of streptomycin by bean plants and its effect on the halo and common blight organisms. Phytopathology **44**, 25–30.

Nickell L.G. 1952. Stimulation of plant growth by antibiotics. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **80**, 615–617.

— 1953. Antibiotics in the growth of plants. Antibiotics and Chemotherapy **3**, 449–459.

— 1959. Antimicrobial activity of vascular plants. Economic Bot. **13**, 281–318.

— und A.C.Finlay. 1954. Antibiotics and their effects on plant growth. J. Agric. and Food Chem. **2**, 178–182.

Nooden L.D. und K.V.Thimann. 1963. Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **50**, 194–200.

Norman A.G. 1959. Inhibition of root growth and cation uptake by antibiotics. Soil Sci. Soc. Proc. **23**, 368–370.

Otte H.J. 1965. Leitfaden der medizinischen Mikrobiologie. G. Fischer, Stuttgart, 3. Aufl.

Ovsyannikova M.N. 1965. Translocation of streptomycin in vascular plants. Mikrobiologiya **34**, 121–127.

Parthier B. 1965. Effect of antibiotics on the uptake of ^{35}S-methionine and $^{32}PO_4$ and on their incorporation into protein and RNA of green tobacco leaves. Nature **206**, 783–784.

Penny P. und A.W.Galston. 1966. The kinetics of inhibition of auxin-induced growth in green pea stem segments by actinomycin D and other substances. Amer. J. Bot. **53**, 1–7.

Pestka S., R.Marshall und M.Nivenberg. 1965. RNA codewords and protein synthesis V. Effect of streptomycin on the formation of ribosome-sRNA complexes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **53**, 639–646.

Pramer D. 1954. The movement of chloramphenicol and streptomycin in broad bean and tomato plants. Ann. Bot. **18** NS, 463–470.

— 1956. Absorption of antibiotics by plant cells. II. Streptomycin. Arch. Biochem. Biophys. **62**, 265–273.

Rogers H.J. und J.Jeljaszewicz. 1961. Inhibition of the biosynthesis of cell-wall mucopeptides by the penicillins. Biochem. J. **81**, 576–584.

Rosen W.G. 1957. A possible mechanism for inhibition of plant growth by streptomycin. Plant Physiol. **32**, suppl. viii.

— und St.R.Gawlik. 1961. Effect of streptomycin on chlorophyll accumulation in *Euglena gracilis*. J. Protozool. **8**, 90–96.

Rossner W. 1960. Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluss von Streptomycin auf *Sinapis alba* L. Protoplasma **52**, 580–610.

Russell R.S. 1954. The relationship between metabolism and the accumulation of ions by plants. Symp. Soc. Exp. Biol. **8**, 343–366.

Sato Y. 1959. Effect of streptomycin on the chlorophyll formation in the timothy. I. Morphological observations. Keio J. Med. **8**, 187–198.

— 1960. Effect of streptomycin on the chlorophyll formation in the timothy. II. Influences of inorganic salts upon the streptomycin effect on the timothy seeds (under a resting condition). Keio J. Med. **9**, 25–32.

Schopfer W.H., M.Bein und G.Besson. 1951. Action de la streptomycine et de la chloramphenicol sur la biogenèse de la chlorophylle et des caroténoïdes chez *Pisum*. Schweiz. Natf. Ges. **131**, 148–149.

— E.Grob, G.Besson und V.Keller. 1952. Recherches sur les inhibiteurs du développement et de la biogenèse des caroténoïdes. I. La streptomycine. Arch. des Sciences (Genève) **5**, 194–197.

Seiler L. 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 622–663. (Diss. Basel).

Signol M. 1961. Comparaison de l'action de la dihydrostreptomycine à celle de l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyl-tétronique sur l'infrastructure des chloroplastes de *Zea Mays* L. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris **252**, 1993–1995.

Sosnova V. und E.Hrabetova. 1958. Die Wirkung von D-Chloramphenicol auf die zytoplasmatischen Strukturen meristematischer Zellen. Naturwissenschaften **45**, 22–23.

Srivastava B.I.S. und W.O.S.Meredith. 1962. Mechanism of action of gibberellic acid. Inhibition of α-amylase development during germination of barley by chloramphenicol and its reversal by gibberellic acid. Canad. J. Bot. **40**, 1257–1265.

Stahl E. 1962. Dünnschicht-Chromatographie. Springer, Berlin.

Steward F.C. 1954. Salt accumulation in plants: A reconsideration of the role of growth and metabolism. B. Salt accumulation in the plant body. Symp. Soc. Exp. Biol. **8**, 393–406.

— und F.K.Millar. 1954. Salt accumulation in plants: A reconsideration of the role of growth and metabolism. A. Salt accumulation as a cellular phenomenon. Symp. Soc. Exp. Biol. **8**, 367–393.

— und C.Preston 1941. Effects of pH and the components of bicarbonate and phosphate buffered solutions on the metabolism of potato discs and their ability to absorb ions. Plant Physiol. **16**, 481–519.

Stoner C.D., T.K.Hodges und J.B.Hanson. 1964. Chloramphenicol as an inhibitor of energy-linked processes in maize mitochondria. Nature **203**, 258–261.

Strominger J.L. und D.J.Tipper. 1965. Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents. Amer. J. Med. **39**, 708–721.

Sutcliffe J.F. 1960. New evidence for a relationship between ion absorption and protein turnover in plant cells. Nature **188**, 294–297.

Uhler R.L. 1961. Inhibitory effects of chloramphenicol on cation absorption by plants. Ann. Rep. Hanford Biol. Labor., Hanford Biol. Res. Ann. Rep. **HW-72500**, 123.

— und R.S.Russell. 1963. Chloramphenicol inhibition of salt absorption by intact plants. J. Exp. Bot. **14**, 431–437.

Vöchting A. 1953. Über die Zinkaufnahme von *Zea Mays* L. und *Aspergillus niger* v.Tiegh. in Einzelkultur und Mischkultur. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**, 103–161 (Diss. Basel).

Vogel H. 1951. Die Antibiotika. Hans Carl, Nürnberg.

Weihe von K. 1953. Die Wirkung von Na-Benzyl-Penicillin auf die Samenkeimung und das Wurzelwachstum. Naturwissenschaften **40**, 203–204.

Weisberger A. S. und S.Wolfe. 1964. Effect of chloramphenicol on protein synthesis. Fed. Proc. **23**, 976–983.

Winter A.G. 1952. Untersuchungen über die Aufnahme von Penicillin und Streptomycin durch die Wurzel von *Lepidium sativum* L. und ihre Beständigkeit in natürlichen Böden. Z. Bot. **40**, 153–172.

— und L.Willeke. 1952a. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen. IV. Hemmstoffe im herbstlichen Laub. Naturwissenschaften **39**, 45–46.

— 1952b. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen. V. Hemmstoffe in Blättern und Blattstreu der Gramineae. Naturwissenschaften **39**, 190–191.

— 1951. Über die Aufnahme von Antibioticis durch höhere Pflanzen und ihre Stabilität in natürlichen Böden. Naturwissenschaften **38**, 457–458.

— 1951a. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie. Naturwissenschaften **38**, 262–264.

Wolters B. 1964. Antibiotisch und toxisch wirkende Substanzen aus Algen und Moosen. Planta Med. **12**, 85–99.

Wright J.M. 1951. Phytotoxic effects of some antibiotics. Ann. Bot. **15 NS**, 493–499.

Yudkin M.D. 1963. The effect of penicillin, novobiocin, streptomycin and vancomycin of membrane synthesis by protoplasts of *Bacillus megaterium*. Biochem. J. **89**, 290–296.

Zähner H. 1964. Antibiotika in der Mikrobiologie. Natwiss. Rundschau **17**, 391–399.

— 1965. Biologie der Antibiotika. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Zahn G. 1962a. Die Wechselwirkung zwischen Streptomycin und verschiedenen Metallionen. Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus des Streptomycins in der höheren Pflanze. Naturwissenschaften **49**, 139.

— 1962b. Streptomycin und Metallionen. I. Der Einfluss einiger Schwermetalle, Mikro- und Makronährstoffe auf die Phytotoxizität des Streptomycins. Phytopath. Z. **45**, 345–363.

— 1962c. Streptomycin und Metallionen. Untersuchungen mit Calcium, Magnesium und Mangan. Flora **152**, 655–669.

Curriculum vitae

Am 19. Mai 1937 wurde ich, Gerhard Kurt Hool, Sohn des Kurt Hool, kaufmännischen Angestellten, und seiner Frau Hilde geb. Winzheimer, in Solothurn geboren.

Ich besuchte daselbst die Primarschule und trat 1950 in die Kantonsschule (Realschule) ein, wo ich 1956 mit der Maturität Typus C abschloss.

Im Herbst 1956 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern und besuchte die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Dozenten: W. Buser, W. Feitknecht, F. Lehmann, W. Schopfer † und R. Signer.

Im Frühjahr 1958 zog ich mit meinen Angehörigen nach Basel und immatrikulierte mich in der Folge an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. Ich widmete mich dem Studium der Botanik, Chemie, physikalischen Chemie und Bakteriologie, ergänzt durch Studien in Zoologie und Physik. In Chemie, physikalischer Chemie und Bakteriologie legte ich Nebenfachprüfungen ab. Von Jahresbeginn 1962 bis Frühjahr 1967 war ich Assistent der Praktika am Botanischen Institut Basel. Im Frühjahr 1963 begann ich mit der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber.

Während meiner Studienzeit in Basel besuchte ich die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Dozenten: P. Bärtschi, E. Batschelet, H. Erlenmeyer, E. Flückiger, M. Geiger-Huber, P. Huber, K. Jaspers, L. Jenny, W. Kuhn †, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, W. Roth, H. Seiler, Ch. Tamm, J. Tomcsik †, W. Vischer †, R. Wizinger und H. Zoller.

Meinen verehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen besten Dank aus.